



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

# TESIS DE DOCTORADO

PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS INFECCIONES  
DEL TRACTO REPRODUCTOR MASCULINO EN  
REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

Ernesto Veiga Álvarez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y  
PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA  
2019







## **DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS**

### **Protocolo de estudio de las infecciones del tracto reproductor masculino en reproducción humana asistida**

D. Ernesto Veiga Álvarez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mí trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

*En Santiago, 3 de mayo de 2019*

Fdo. Ernesto Veiga Álvarez





## **AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES / TUTOR DE LA TESIS**

### **Protocolo de estudio de las infecciones del tracto reproductor masculino en reproducción humana asistida**

**D. Benito José Regueiro García (Director).** Catedrático de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela.

**Dña. Mercedes Treviño Castellano. (Directora).** Facultativa Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS).

**D. Manuel Macía Cortiñas (Director).** Profesor Titular de Ginecología y Obstetricia del Departamento de Ciencias Forenses, Anatomía Patológica, Ginecología y Obstetricia y Pediatría de la Universidad de Santiago de Compostela.

**D. Rafael Seoane Prado (Tutor).** Catedrático de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela.

#### **INFORMAN:**

*Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. Ernesto Veiga Álvarez, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de los Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 3 de mayo de 2019*

Fdo. Benito José Regueiro García

Fdo. Mercedes Treviño Castellano

Fdo. Manuel Macía Cortiñas

Fdo. Rafael Seoane Prado





## Conflicto de interés

El doctorando, Ernesto Veiga Álvarez, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con esta tesis doctoral.

Fdo. Ernesto Veiga Álvarez





***- A Caren, Iria, Iago y a nuestras familias***

***“Ningún éxito externo compensa  
el fracaso en el hogar”***

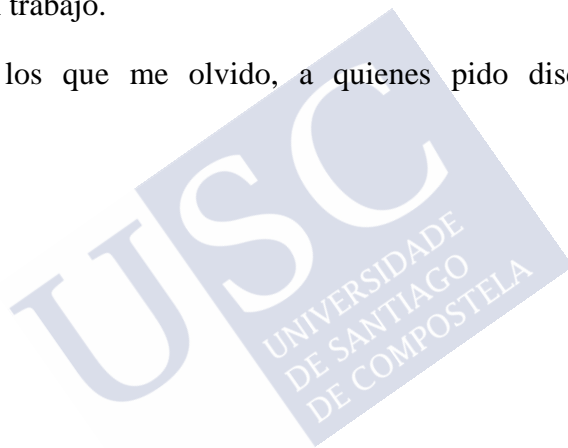




## **Agradecimientos**

- A los pacientes, que han dado sentido a este trabajo.
- Al Hospital Clínico Universitario de Santiago, en la persona de su Gerente, expreso mi reconocimiento por todo el apoyo concedido.
- A la Universidad de Santiago de Compostela en la persona de la Dra. Alicia Estévez Toranzo expreso igualmente mi reconocimiento por todo el apoyo concedido. Un agradecimiento especial al Catedrático de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, el Dr. Rafael Seoane Prado por todas las facilidades concedidas a lo largo de este trabajo.
- A la Codirectora de la Tesis, Dra. Mercedes Treviño Castellano, por su constante interés, dedicación, estricta supervisión, apoyo incondicional a lo largo de este trabajo y por su amistad. Al Prof. Dr. Manuel Macía Cortiñas, Codirector de la presente tesis, por su apoyo y consejo desde el inicio, por su asesoría, y por su amistad. A ambos codirectores agradezco asimismo las preciosas sugerencias y críticas constructivas. Al Director de la Tesis Dr. Benito José Regueiro García por facilitarme la colaboración entre la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Clínico Universitario de Santiago (URHA-CHUS) y el Servicio de Microbiología.
- A los compañeros de la URHA-CHUS, por el apoyo constante en la realización de este trabajo.
- A los compañeros del Laboratorio de Microbiología. Un agradecimiento muy especial al Dr. Daniel Navarro de la Cruz por su colaboración en la realización del trabajo experimental.

- Al Dr. Francisco Gude Sampedro por su preciada ayuda en la orientación del análisis y procesamiento estadístico de los datos, así como por haber despertado mi interés por la estadística.
- Al personal de la Biblioteca del CHUS, especialmente a Teresa Cabana Ínsua.
- Al SERGAS por los recursos aportados para el estudio de las parejas de la URHA-CHUS.
- A Miguel Angel Suárez por su trabajo y paciencia para la maquetación del trabajo.
- A todos de los que me olvido, a quienes pido disculpas de antemano.



## ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos .....	xi
ÍNDICE GENERAL.....	xiii
Abreviaturas .....	xxiii
Índice de figuras.....	xxix
Índice de tablas .....	xxxí
Índice de esquemas .....	xxxv
Anexos .....	xxxvii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aparato genitourinario masculino.....	5
1.1.1 Testículos.....	6
1.1.2 Vías seminales .....	6
1.1.3 Glándulas accesorias.....	7
1.2 Técnicas de preparación del semen para uso en Técnicas de Reproducción Humana Asistida.....	7
1.2.1 Dilución simple y lavado.....	10
1.2.2 Migración espermática ( <i>swim-up</i> ). .....	10
1.2.3 Procedimientos de lavado selectivo: gradientes de densidad.....	10
1.3 Causas de esterilidad y Técnicas de Reproducción Humana Asistida (criterios de la URHA-CHUS).....	11
1.3.1 Inseminación Artificial (IA) .....	11
1.3.1.1 Las indicaciones generales para la IAC incluyen:.....	12
1.3.1.1.1 Masculinas:.....	12
1.3.1.1.2 Femeninas: .....	12

1.3.1.1.3 Factor mixto:.....	12
1.3.1.2 Las indicaciones generales para las IAD incluyen: .....	12
1.3.2 FIV .....	13
1.3.3 ICSI .....	14
1.4 Microorganismos asociados a ITREM .....	15
1.4.1 Bacterias.....	17
1.4.1.1 Aerobias.....	17
1.4.1.1.1. Gram positivas .....	17
1.4.1.1.2. Gram negativas .....	17
1.4.1.2. Anaerobias .....	18
1.4.1.3. Intracelulares .....	18
1.4.1.3.1. Micoplasmas genitales.....	18
1.4.1.3.2. Chlamydia trachomatis .....	18
1.4.1.3.3. Micobacterias.....	18
1.4.2. Hongos .....	18
1.4.3. Protozoos .....	19
1.4.4. Virus.....	19
1.4.4.1. Virus del papiloma humano (VPH).....	19
1.4.4.2. Virus de la hepatitis B, C y Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	25
1.4.4.3. Otros virus .....	25
1.5 ITREM: epidemiología, diagnóstico microbiológico y efecto sobre la fertilidad.....	25
1.5.1 Balanitis .....	25
1.5.1.1 Epidemiología.....	25
1.5.1.2 Diagnóstico microbiológico.....	25
1.5.1.3 Efecto de la balanitis sobre la fertilidad .....	26
1.5.2 Uretritis primaria.....	26
1.5.2.1. Epidemiología.....	26
1.5.2.2 Diagnóstico microbiológico.....	28
1.5.2.3. Efecto de la uretritis masculina sobre la fertilidad .....	29
1.5.2.3.1 N.gonorrhoeae y/o C.trachomatis .....	29
1.5.2.3.2 Ureaplasma spp.....	31
1.5.2.3.3 Mycoplasma spp.....	32
1.5.2.3.4 T.vaginalis .....	32
1.5.3 Prostatitis .....	32
1.5.3.1 Definición .....	32
1.5.3.2 Clasificación de las prostatitis y epidemiología .....	32
1.5.3.3 Diagnóstico clínico y microbiológico.....	35

1.5.3.4 Efecto de la prostatitis sobre la fertilidad .....	37
1.5.4 Epididimitis .....	38
1.5.4.1 Epidemiología .....	38
1.5.4.2 Clasificación y diagnóstico .....	38
1.5.4.3 Efecto de la epididimitis sobre la fertilidad.....	39
1.5.5 Orquitis .....	40
1.5.5.1 Efecto de la orquitis sobre la fertilidad.....	40
1.6 Microorganismos y TRHA.....	40
1.6.1 Importancia del examen microbiológico del TREM antes de realizar una TRHA.....	42
1.7 Estudio del semen (WHO, 2010) .....	44
1.7.1 Examen macroscópico inicial.....	44
1.7.1.1 Licuefacción .....	44
1.7.1.2 Viscosidad .....	45
1.7.1.3 Volumen .....	45
1.7.1.4 pH.....	45
1.7.2 Examen microscópico inicial.....	46
1.7.2.1 Aglutinación y agregación espermática.....	46
1.7.2.2 Otras células distintas a los espermatozoides.....	46
1.7.3 Examen microscópico avanzado.....	47
1.7.3.1 Evaluación de la movilidad espermática .....	47
1.7.3.1.1 Categorías de la movilidad espermática .....	47
1.7.3.2 Evaluación de la concentración espermática .....	48
1.7.3.3 Morfología espermática.....	48
1.7.3.3.1 Método de tinción rápida para evaluación de la morfología espermática .....	49
1.7.3.3.2 Valoración de un espermatozoide morfológicamente normal .....	49
1.7.3.3.3 Valoración de defectos espermáticos específicos (Menkveld, 2010) .....	50
1.7.3.3.3.1 Defectos en los espermatozoides determinados genéticamente (Menkveld, 2010) .....	50
1.7.3.3.3.2 Aberraciones de la morfología de los espermatozoides no genéticas (Menkveld, 2010). ..	51
1.7.3.4 Vitalidad .....	53
1.7.3.5 Leucocitos en las muestras de orina/semen/fluido prostático .....	53
1.7.4 Estudio inmunológico.....	55
1.7.4.1. Anticuerpos anti-espermatozoides .....	55

1.7.4.1.1 Prueba directa para la detección de anticuerpos unidos a los espermatozoides: reacción de antiglobulina mixta (Mixed Antiglobulin Reaction, MAR test) .....	56
1.8 Indicaciones para el análisis microbiológico del semen.....	56
1.9 Diagnóstico microbiológico .....	58
1.9.1 Observación microscópica de la muestra.....	58
1.9.1.1 Examen en fresco.....	58
1.9.1.2 Frotis teñidos .....	58
1.9.2 Cultivo .....	58
1.9.2.1 Cultivo convencional.....	58
1.9.3 Detección de ácidos nucleicos .....	59
<b>2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
2.1 Hipótesis.....	61
2.2 Objetivos.....	62
2.2.1 Objetivo general.....	62
2.2.2 Objetivos específicos .....	62
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1 Protocolo de estudio de las ITREM en RHA .....	65
3.1.1 Diseño del estudio.....	65
3.1.1.1 Pacientes .....	65
3.1.1.2 Tipo de estudio .....	65
3.1.1.3 Tamaño de la muestra.....	65
3.1.1.4 Selección de los participantes .....	66
3.1.1.5 Aspectos ético-legales .....	69
3.1.1.6 Protocolo de estudio propuesto (ver Esquema 3.1) .....	70
3.1.1.6.1 Estudio semicualitativo de encuesta con respuesta fija. ....	70
3.1.1.6.2 Detección de los microorganismos habitualmente asociados a colonización/infección del TREM.....	70
3.1.1.6.3 Seminograma .....	72
3.1.1.6.4 Condiciones preanalíticas para la recogida del semen y de la orina .....	72
3.1.1.7 Tratamiento de las ITREM detectadas .....	72
3.1.1.8 Variables y mediciones.....	73

3.1.1.8.1 Datos demográficos y antecedentes personales de la Historia Clínica.....	73
3.1.1.8.2 Infección del tracto reproductivo masculino (ITREM).....	74
3.1.1.8.3 Bacteriospermia.....	74
3.1.1.8.4 Hongos.....	74
3.1.1.8.5 Seminograma.....	75
3.1.1.8.6 Cuestionario NIH-CPSI (puntuación, ver anexo 5):.....	76
3.1.1.9 Análisis estadístico.....	77
3.1.1.10 Recursos disponibles.....	79
3.1.1.11 Financiación.....	79
3.1.1.12 Tareas desarrolladas por el doctorando.....	80
3.1.1.13 Tareas desarrolladas por el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago.....	80
3.1.2 Seminograma completo.....	81
3.1.2.1 Recolección de la muestra.....	81
3.1.2.2 Instrucciones a los individuos.....	81
3.1.2.3 Equipo y materiales.....	81
3.1.2.4 Secuencia en la realización del seminograma.....	84
3.1.2.5 Examen macroscópico inicial.....	85
3.1.2.5.1 Licuefacción.....	85
3.1.2.5.2. Viscosidad.....	85
3.1.2.5.3. Volumen.....	86
3.1.2.5.4 pH.....	86
3.1.2.6. Examen microscópico inicial.....	86
3.1.2.6.1 Agregación y aglutinación espermática.....	87
3.1.2.6.2 Otras células distintas a los espermatozoides.....	87
3.1.2.6.3 Evaluación de la movilidad espermática.....	89
3.1.2.6.3.1. Categorías de la movilidad espermática.....	90
3.1.2.6.4 Evaluación de la concentración espermática.....	91
3.1.2.6.4.1 Azoospermia u oligozoospermia severa.....	92
3.1.2.6.5. Evaluación de la morfología espermática.....	92
3.1.2.6.6. Valoración de la vitalidad mediante la tinción de eosina-nigrosina.....	95
3.1.2.6.7. Prueba de anticuerpos anti-espermatozoides.....	96
3.1.2.6.7.1. Prueba directa para la detección de anticuerpos unidos a los espermatozoides: reacción de antiglobulina mixta (MAR test).....	96

3.1.2.7 Estudio funcional: procedimiento de la técnica gradientes de densidad para la selección de espermatozoides .....	98
3.1.3. Técnicas microbiológicas.....	100
3.1.3.1. Observación microscópica.....	100
3.1.3.1.1 Frotis teñidos .....	100
3.1.3.1.1.1. Protocolo de la tinción de Gram .....	101
3.1.3.2. Detección de microorganismos por PCR en tiempo real ...	101
3.1.3.2.1. Chlamydia trachomatis y Neisseria gonorrhoeae .....	101
3.1.3.2.2. M.genitalium/hominis y U.urealyticum/parvum .....	102
3.1.3.2.3. Virus del papiloma humano (VPH) .....	103
3.1.3.3. Cultivo bacteriano.....	104
3.1.3.4. Interpretación de los hallazgos de los cultivos, umbral de positividad .....	104
3.1.3.5. Identificación bacteriana.....	104
3.1.3.6. Antibiograma .....	104
3.1.3.6.1. Microdilución en caldo .....	107
3.1.3.6.2. Difusión en agar.....	107
4 RESULTADOS .....	109
4.1 Características de la población a estudio (ver tabla 4.1) .....	109
4.1.1 Estudio microbiológico.....	114
4.1.2 Estudio de esterilidad.....	114
4.1.3 Consumo de tóxicos.....	116
4.2 Tinción de gram del semen.....	116
4.3 <i>T.vaginalis</i> en el semen .....	117
4.4 Protocolo Meares-stamey modificado .....	117
4.4.1 Cultivos con microbiota abundante .....	117
4.4.2 Resultados del cultivo convencional.....	118
4.5 Antibiograma.....	119
4.6 Estudio de micoplasmas (en O1).....	119
4.7 Tratamiento de micoplasmas (en O1).....	119
4.7.1 Tratamiento de <i>U.urealyticum/parvum</i> .....	119
4.7.1.1 Azitromicina .....	119
4.7.1.2 Doxiciclina.....	121
4.7.2 Tratamiento de <i>M.hominis</i> .....	121



4.8 Estudio de <i>C.trachomatis</i> (en O1).....	122
4.9 Estudio de <i>N.gonorrhoeae</i> (en O1) .....	122
4.10 Estudio del VPH (en semen) .....	122
4.11 Pruebas de normalidad de las variables objeto de estudio del seminograma. Análisis descriptivo de los parámetros del semen. ...	123
4.12 Leucocitos PMN en semen.....	126
4.12.1 Evaluación de los pacientes que tienen PMN (42/205) .....	126
4.12.2 Presencia de leucocitospermia (> 1 millón/mL de PMN según la WHO 2010) en el semen (SE).....	127
4.13 Evaluación de si el consumo de tabaco es una variable de interacción en los datos obtenidos del seminograma. ....	128
4.13.1 Parámetros cuantitativos.....	128
4.13.2 Viscosidad .....	129
4.13.3 Espermatozoides agregados.....	130
4.13.4 Espermatozoides aglutinados .....	130
4.13.5 Prueba MARTest.....	130
4.13.6 Alteración de las características de los espermatozoides.....	130
4.14 Evaluación de si el consumo de alcohol es una variable de interacción en los datos obtenidos del seminograma. ....	131
4.15 Asociación entre los parámetros del semen y la presencia de microorganismos en el tracto genitourinario. Ver anexo 7 .....	132
4.15.1 Parámetros cuantitativos.....	132
4.15.2 Viscosidad .....	134
4.15.3 Espermatozoides agregados.....	135
4.15.4 Espermatozoides aglutinados .....	136
4.15.5 MARTest .....	136
4.15.6 Alteración de las características de los espermatozoides.....	136
4.16 Evaluar si la esterilidad tubárica correlaciona con la presencia de microorganismos en el tracto genitourinario masculino. ....	138
4.17 Relación entre variables con significación estadística y las variables consumo de tabaco e itrem en los hombres .....	141
4.17.1 Regresión lineal simple PR vs tabh .....	142
4.17.2 Regresión lineal simple PR vs. itrem.....	143
4.17.3 Regresión lineal múltiple PR vs tabh + itrem.....	144
4.17.4 Regresión lineal simple lnINM vs tabh .....	146
4.17.5 Regresión lineal simple lnINM vs itrem.....	148

4.17.6 Regresión lineal múltiple lnINM vs tabh + itrem .....	149
4.18 Resultados del cuestionario NIH-CPSI .....	152
4.18.1 Uso del cuestionario NIH-CPSI para predecir prostatitis .....	152
4.18.2 Uso del cuestionario NIH-CPSI para predecir ITREM .....	153
5 DISCUSIÓN .....	159
5.1 Población a estudio.....	159
5.1.1 Tamaño muestral.....	159
5.1.2 Muestras a estudiar .....	160
5.1.3 Interpretación de los resultados .....	162
5.2 Prevalencia en la población a estudio de los distintos microorganismos detectados .....	165
5.2.1 Estudio microbiológico de prostatitis .....	165
5.2.2 Micoplasmas en O1 y tratamiento .....	166
5.2.2.1 Cribado de micoplasmas en O1 .....	166
a) Como potenciales patógenos causantes de enfermedad urogenital .....	170
b) Como causantes de mala calidad del semen y esterilidad .....	170
c) Como agentes causantes de efectos adversos durante la gestación e infección fetal y neonatal .....	172
d) Reducción de costes .....	174
5.2.2.2 Tratamiento de micoplasmas.....	176
5.2.3 <i>N.gonorrhoeae</i> y <i>C.trachomatis</i> en O1 .....	180
5.2.3.1. <i>N.gonorrhoeae</i> .....	180
5.2.3.2. <i>C.trachomatis</i> .....	180
5.2.4 VPH .....	183
5.3 Estudio de asociación entre la infección del tracto urogenital masculino y los parámetros estudiados en el análisis seminal. ....	187
5.4 ITREM y esterilidad tubárica .....	193
5.5 Cuestionario NIH-CPSI e ITREM.....	195
5.6 Fortalezas y Limitaciones del estudio. Directrices futuras. ....	195
6 CONCLUSIONES .....	199
7 RESUMEN .....	201

8 SUMMARY.....	207
9 RESUMO.....	213
10 BIBLIOGRAFÍA.....	219
11 MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	265





## Abreviaturas

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico.
ADNc:	ADN complementario.
AINE:	AntiInflamatorios No Esteroideos.
AMM:	Asociación Médica Mundial.
ARN:	Ácido Ribonucleico.
ASCUS:	células escamosas atípicas de importancia no determinada o <i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i> .
AUC:	área bajo la curva o <i>Area Under Curve</i> .
BGNMF:	Bacilos GramNegativos No Fermentadores.
CASA:	análisis espermático computerizado o <i>Computer-Aided Sperm Analysis</i> .
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria.
CMV:	citomegalovirus.
CP/CPPS:	prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico o <i>Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome</i> .
CPPS:	síndrome de dolor pélvico crónico o <i>Chronic Pelvic Pain Syndrome</i> .
CPSI:	índice de síntomas de prostatitis crónica o <i>Chronic Prostatitis Symptom Index</i> .
Cq:	<i>Cycle quantification</i> .
CRD:	Cuaderno de Recogida de Datos.
CUA:	<i>Canadian Urological Association</i> .

DGP:	Diagnóstico Genético Preimplantacional.
dNTPs:	desoxirribonucleótidos trifosfato o <i>deoxyNucleotide TriPhosphates</i> .
EAU:	<i>European Association of Urology</i> .
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> .
EIP:	Enfermedad Inflamatoria Pélvica.
EOD:	Esterilidad de Origen Desconocido.
ERO:	Especies Reactivas de Oxígeno.
ETR:	Ecografía TransRectal.
FDA:	Administración de alimentos y medicamentos o <i>Food and Drug Administration</i> .
FDE:	Fragmentación del ácido Desoxirribonucleico Espermático.
FFER:	Federación Francesa para el Estudio de la Reproducción o <i>Fédération Française d'Étude de la Reproduction</i> .
FISH:	Hibridación in situ Fluorescente o <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> .
FIV:	Fecundación in Vitro o <i>In Vitro Fertilization, IVF</i> .
FOO:	Fallo Ovárico Oculto.
FP:	Fluido Prostático post-masaje prostático.
GD:	Gradientes de Densidad.
GnRH:	Hormona liberadora de gonadotropina o <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> .
HCG:	gonadotrofina coriónica humana o <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> .
HBP:	Hiperplasia Benigna de Próstata.
HOS Test:	test hipo-osmótico o <i>HypOsmotic Swelling Test</i> .

HPF:	campo de alta potencia o <i>High Power Field</i> .
IA:	Inseminación Artificial.
IAC:	Inseminación Artificial con semen de Cónyuge.
IAD:	Inseminación Artificial con semen de Donante.
ICSI:	inyección intracitoplasmática de espermatozoides o <i>IntraCytoplasmic Sperm Injection</i> .
IIU:	Inseminación IntraUterina.
INM:	porcentaje de espermatozoides INMóviles.
IPCN:	<i>International Prostatitis Collaborative Network</i> .
ITREM:	Infección/es del Tracto Reproductivo Masculino.
ITS:	Infección de Transmisión Sexual.
ITU:	Infección del Tracto Urinario.
LSIL:	lesión escamosa intraepitelial de bajo grado o <i>Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LGSIL</i> .
MAGI:	infección de las glándulas accesorias masculinas o <i>Male Accessory Gland Infection</i> .
MAR test:	prueba de la reacción de antiglobulina mixta o <i>Mixed Antiglobulin Reaction test</i> .
NAAT:	test de amplificación de ácidos nucleicos o <i>Nucleic Acid Amplification Test</i> .
NIDDK:	<i>National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases</i> .
NIH:	<i>National Institutes of Health</i> .
NGS:	<i>Next Generation Sequencing</i> .
NPR:	porcentaje de espermatozoides No PRogresivos.
NSIL:	negativo para lesión escamosa intraepitelial o <i>Negative-Squamous Intraepithelial Lesion</i> .
O1:	Orina de la primera porción.

O2:	Orina de la porción media.
O3:	Orina post-eyaculado u orina post masaje prostático.
PAPPS:	Programa de Actividades Preventivas y de Promoción de la Salud.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa o <i>Polymerase Chain Reaction</i> .
PMN:	leucocitos PoliMorfoNucleares.
PR:	porcentaje de espermatozoides PRogresivos.
PSA:	antígeno prostático específico o <i>Prostate Specific Antigen</i> .
Q-PCR:	PCR cuantitativa o <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> .
REM:	Recuperación de Espermatozoides Móviles.
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa o <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> .
RT-q-PCR:	PCR cuantitativa en tiempo real o <i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i> .
SCA:	sistema CASA de la empresa Microptic o <i>Sperm Class Analyzer</i> .
SCD:	test de dispersión de la cromatina espermática o <i>Sperm Chromatin Dispersion test</i> .
SE:	SEmen/eyaculado.
SEIMC:	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
semFYC:	sociedad española de medicina de Familia Y Comunitaria.
SERGAS:	SERvicio GALlego de Salud.
SOP:	Síndrome de Ovario Poliquístico.



SP:	Secreción Prostática.
T <sub>m</sub> :	temperatura de fusión del DNA o <i>Temperature melting</i> .
TR:	Tacto Rectal.
TRA:	Técnicas de Reproducción Asistida.
TREM:	Tracto Reproductor Masculino.
TRHA:	Técnicas de Reproducción Humana Asistida.
TUNEL:	<i>Terminal dUTP Nick-End Labeling</i> .
UBE (U):	10 gramos de alcohol puro.
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias.
URHA-CHUS:	Unidad de Reproducción Humana Asistida del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago
VEB:	Virus de Epstein-Barr.
VHS:	Virus del Herpes Simple.
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
VPH:	Virus del Papiloma Humano.
WHO:	Organización Mundial de la Salud, OMS o <i>World Health Organization</i> .
XXIS:	Xerencia de Xestión Integrada de Santiago.



## Índice de figuras

Figura 1.1. Sistema reproductor masculino. ....	6
Figura 1.2. Glándulas accesorias. ....	8
Figura 1.3. Algoritmo de decisión tras prueba primaria de VPH. ....	23
Figura 1.4. Tinción de Gram .....	59
Figura 3.1. Espermatozoides agregados unidos a células epiteliales (a), detritus (b) o espermatozoides (c, d). ....	87
Figura 3.2. Grados y tipos de aglutinación espermática. ....	88
Figura 3.3. Equipo estándar SCA <sup>®</sup> de Microptic. ....	89
Figura 3.4. Ejemplo de captura mediante el software SCA <sup>®</sup> para la valoración de los distintos tipos de movilidad espermática. ....	90
Figura 3.5. Valores morfométricos definidos en el software SCA <sup>®</sup> para la valoración de la morfología espermática basado en la WHO 2010. ....	94
Figura 3.6. Ejemplo de captura mediante el software SCA <sup>®</sup> para la valoración de la morfología espermática. ....	95
Figura 3.7. Prueba de vitalidad eosina-nigrosina. ....	96
Figura 3.8 Técnica de gradientes de densidad .....	99
Figura 4.1. Histograma de los valores de la edad de los hombres estudiados. ....	111

Figura 4.2. Histograma de frecuencia de la edad de las mujeres. ....	111
Figura 4.3. Histograma de frecuencia de la duración en meses de la esterilidad en la pareja .....	115
Figura 4.4. Causas de esterilidad de tipo femenino .....	115
Figura 4.5. Causas de esterilidad de tipo masculino.....	116
Figura 4.6. Distribución del número de PMN en las muestras de semen.....	126
Figura 4.7. Esterilidad tubárica y positividad de ITREM .....	139
Figura 4.8. Esterilidad tubárica y detección de <i>U.urealyticum/parvum</i> en la pareja .....	140
Figura 4.9. Diagrama de dispersión que representa los valores exactos frente a los predichos por el modelo PR vs tabh + itrem representando la bondad de ajuste del mismo. ....	145
Figura 4.10. Variable INM tras transformación exponencial para normalizar la misma.....	147
Figura 4.11. Diagrama de dispersión que representa los valores exactos frente a los predichos por el modelo lnINM vs tabh + itrem representando la bondad de ajuste del mismo. ....	150
Figura 4.12. Diagrama de asociación scoreto*itrem .....	155
Figura 4.13 Curva ROC nihcpsito*itrem .....	156

## Índice de tablas

Tabla 1.1. Agentes patógenos, enfermedades de transmisión sexual y relevancia en la fertilidad masculina.....	3
Tabla 1.2. Microorganismos y afectación seminal .....	4
Tabla 1.3. Agentes infecciosos que causan ITREM.....	16
Tabla 1.4. Prevalencia de los microorganismos más comunes aislados de individuos con uretritis no gonocócicas .....	27
Tabla 1.5. Métodos de detección de micoplasmas .....	30
Tabla 1.6. Clasificación de prostatitis de acuerdo al Sistema de Clasificación del NIDDK/NIH .....	33
Tabla 1.7. Clasificación etiológica del síndrome prostático.....	34
Tabla 1.8. Patógenos más frecuentes en las prostatitis .....	35
Tabla 1.9. Infección de las glándulas accesorias masculinas: criterios diagnósticos de la OMS .....	36
Tabla 3.1. Muestras y microorganismos analizados para el diagnóstico de ITREM.....	70
Tabla 3.2. Requisitos para la valoración microscópica del seminograma. ....	91
Tabla 3.3. Medios de cultivo utilizados para el estudio de ITREM en las muestras de orina y semen.....	105
Tabla 3.4. Criterios de positividad para el cultivo de las muestras de orina O1, O2 y O3, así como del semen .....	106

Tabla 3.5. Antibióticos ensayados para la realización del antibiograma.....	108
Tabla 4.1. Datos demográficos y clínicos de la población a estudio (n= 205) .....	112
Tabla 4.2. Cultivos con resultado de microbiota abundante en O1, O2, semen u O3 con recomendación del laboratorio de Microbiología de repetir la toma de muestra para confirmación de contaminación o no. ....	117
Tabla 4.3. Recuento de colonias (UFC/mL) en cultivos con aislamiento de 1 microorganismo puro ( <i>Streptococcus grupo viridans</i> (1)) en O1, O2, SE y O3. ....	118
Tabla 4.4. Número de fallos terapéuticos dependiendo del antibiótico utilizado inicialmente en los pacientes positivos para <i>U.urealyticum/parvum</i> .....	119
Tabla 4.5. Antibióticos utilizados frente a <i>Ureaplasma spp.</i> y resultados del control postratamiento en los casos en que hubo fracaso terapéutico .....	120
Tabla 4.6. Número de fallos terapéuticos dependiendo del antibiótico utilizado para el tratamiento inicial en pacientes positivos para <i>M.hominis</i> .....	121
Tabla 4.7. Coeficientes de asimetría y curtosis de las variables cuantitativas.....	123
Tabla 4.8. Pruebas de normalidad de las variables cuantitativas .....	124
Tabla 4.9. Resumen de las medias de los parámetros cuantitativos evaluados en el seminograma.....	125
Tabla 4.10. Asociación entre la presencia de microorganismos en el tracto urogenital y PMN en el eyaculado .....	127
Tabla 4.11. Asociación entre la presencia de microorganismos en el tracto urogenital y leucocitospermia en el eyaculado ..	128

Tabla 4.12. Asociación entre los parámetros del seminograma cuantitativos y el hecho de ser o no fumador .....	129
Tabla 4.13. Asociación entre los parámetros del seminograma cualitativos y el hecho de ser o no fumador .....	131
Tabla 4.14. Asociación entre los parámetros cuantitativos del seminograma y el hecho de tener o no microorganismos en el tracto urogenital .....	133
Tabla 4.15. Asociación entre los parámetros cualitativos del seminograma y la presencia de microorganismos en el tracto urogenital .....	135
Tabla 4.16. Asociación entre la esterilidad tubárica y el hecho de tener o no una ITREM .....	138
Tabla 4.17. Asociación entre la esterilidad tubárica y presencia o no de <i>U.urealyticum</i> .....	139
Tabla 4.18. Asociación entre la esterilidad tubárica y presencia o no de <i>C.trachomatis</i> .....	140
Tabla 4.19. Pruebas de normalidad de las variables cuantitativas PR e INM .....	142
Tabla 4.20. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable dependiente PR y la independiente tabh .....	143
Tabla 4.21. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable dependiente PR y la independiente itrem .....	144
Tabla 4.22. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal múltiple de la variable dependiente PR y las independientes tabh e itrem .....	145

Tabla 4.23. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable dependiente lnINM y la independiente tabh .....	148
Tabla 4.24. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable dependiente lnINM y la independiente itrem.....	149
Tabla 4.25. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal múltiple de la variable dependiente lnINM y las independientes tabh e itrem .....	151
Tabla 4.26. Puntuación promedio de los distintos ítems del cuestionario NIH-CPSI.....	152
Tabla 4.27. Puntuación suma total de las distintas preguntas del cuestionario NIH-CPSI (scoreto) .....	153
Tabla 4.28. Tabla de contingencia scoreto*itrem.....	154
Tabla 4.29. Tabla nihcpsito*itrem tabulación cruzada.....	157
Tabla 5.1. Asociación micoplasma y efectos adversos sobre el embarazo .....	173
Tabla 5.2. Resumen de la ISIDOG acerca de la importancia de la necesidad de realizar pruebas y tratar los micoplasmas durante el embarazo. ....	174
Tabla Anexo 1. Características de los medios de cultivo utilizados para el estudio de ITREM en las muestras de orina y semen.....	267



## Índice de esquemas

Esquema 3.1. Protocolo de estudio de ITREM en RHA. ....	71
Esquema 4.1. Participantes en el estudio .....	110





## **Anexos**

Anexo 1. Características de los medios de cultivo utilizados para el estudio de ITREM en las muestras de orina y semen. ....	267
Anexo 2. RECOGIDA DE MUESTRAS DE SEMEN Y ORINA “PROTOCOLO ESTUDIO PREVIO TRHA” (técnica de Meares-Stamey modificada) .....	281
Anexo 3. Hoja de información y consentimiento informado DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO (ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (castellano) .....	285
Anexo 4. Folla de información e consentemento informado DESARROLLO DUN PROTOCOLO DE ESTUDO DAS INFECCIÓN DO TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO (ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (galego) .....	295
Anexo 5. Índice de Síntomas de Prostatitis Crónica (NIH-CPSI) (versión en español) .....	303
Anexo 6. Normas para la recolección de una muestra de semen .....	305
Anexo 7. Variables analizadas mediante SPSS .....	307
Anexo 8. Permisos para reproducir material.....	317
Anexo 9. Aspectos éticos .....	321



## 1 INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la esterilidad masculina se basa habitualmente en la normalidad del análisis espermático pero la causa más importante de esterilidad en el hombre es la infección del tracto reproductor masculino (ITREM) (Urata y *col.*, 2001; Sanocka y *col.*, 2004). También las pruebas que detectan la fragmentación del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) espermático (FDE) han demostrado con suficiente evidencia científica, que son capaces de diferenciar a hombres fértiles de hombres estériles. De hecho, elevados niveles de FDE se correlacionan con bajas tasas de fecundación, bajas tasas de embarazo y de implantación, y un aumento en las tasas de aborto (Larson y *col.*, 2000).

El daño sobre el ADN espermático se observa tanto en los espermatozoides testiculares y epididimarios como en los eyaculados. Este daño puede ser ocasionado tanto por factores intrínsecos como extrínsecos (daño iatrogénico) (González-Marín y *col.*, 2012) y el propio espermatozoide no posee mecanismos de reparación del mismo. El impacto real sobre las tasas de niño nacido en las Técnicas de Reproducción Humana Asistida (TRHA), puede verse parcialmente diluido gracias a los mecanismos de reparación que posee el ovocito, el cigoto y el propio embrión en los estadios tempranos del desarrollo. Hoy en día se están evaluando pruebas que sean capaces de informar sobre la reparabilidad conseguida. Lo que sí sabemos es que las consecuencias finales (reparación, reparación parcial o no reparación del daño) dependerán del tipo y grado del daño espermático, así como de la capacidad o de lo sano que sea el ovocito para intentar ayudar a su reparación. De hecho, ya en el año 1984, Tomar y *col.* (Tomar y *col.*, 1984) demostraron que el 80% de las aberraciones cromosómicas estructurales "de novo" aparecidas durante el reordenamiento de los cromosomas son de origen paterno. Es por ello que estudios como el de Greco y *col.* (Greco y *col.*, 2005) encuentran tasas de embarazo del

44% cuando el porcentaje de espermatozoides fragmentados evaluados mediante la prueba *Terminal dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL) está por debajo del 6%, y sólo del 5% cuando la fragmentación supera el 15%.

Dentro de las causas extrínsecas de la FDE se encuentran las infecciones sintomáticas y asintomáticas del tracto urogenital masculino, siendo posible evitar su implicación en la esterilidad masculina. Las ITREM engloban las infecciones del tracto genitourinario (balanitis, uretritis, prostatitis, epididimitis y orquitis) y las de las glándulas accesorias de naturaleza bacteriana, fúngica, parasitaria o viral, suponiendo hasta un 15% de las causas de esterilidad masculina (Nieschlag y Behre, 1997; Pellati y col., 2008) y estando presentes hasta en el 45% de los individuos estériles (ver **tabla 1.1**). Los agentes infecciosos afectan a la fertilidad masculina dañando a las células a través de mediadores de la inflamación, por obstrucción de conductos o bien uniéndose a los espermatozoides. En la **tabla 1.2** se resume la evidencia científica actual de cómo afectan los diferentes microorganismos a la calidad seminal y los fenómenos mediante los que ejercen su efecto dañino.

El proceso infeccioso puede afectar a la fertilidad por diferentes mecanismos entre los que se incluye el deterioro de la espermatogénesis, la alteración de la función espermática, y la obstrucción del tracto seminal (Bar-Chama y Fisch, 1993; Purvis y Christiansen, 1993).

Ya sea por adhesión y/o aglutinación, algunos microorganismos pueden inmovilizar a las células espermáticas. Este efecto depende de la concentración bacteriana en el semen (Tuttle y col., 1977 a, b; Wolner-Hanssen y col., 1984; Busolo y col., 1984; Auroux y col., 1991; Monga y Roberts, 1994). Además la unión de las bacterias a los espermatozoides puede dificultar la unión al ovocito de los mismos.

**Tabla 1.1. Agentes patógenos, enfermedades de transmisión sexual y relevancia en la fertilidad masculina**

Enfermedad	Agente patógeno	Relevancia para la fertilidad
<b>Bacteria</b>		
Gonorrea	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Hombre +, Mujer +
Infección por <i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i> (D-K)	Hombre ?, Mujer +
Uretritis (debida a)	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Puede afectar a la motilidad, cromatina espermática?
Sífilis	<i>Treponema pallidum</i>	Co-factor para la transmisión del VIH Lesiones testiculares +, Mujer +
Chancroide	<i>Haemophilus ducrey</i>	-
Linfogranuloma venéreo	<i>Chlamydia trachomatis</i> (L1-L3)	-
Granuloma inguinal	<i>Klebsiella granulomatis</i>	-
<b>Virus</b>		
SIDA o no	VIH	Hombre +
Mononucleosis	CMV	-
Infección asintomática o no	VHS	Afectación calidad seminal?
Infección asintomática o no	VPH	Afectación calidad seminal? Astenozoospermia
Infección sintomática o asintomática	Adenovirus	Esterilidad?
Parotiditis	Virus paperas	Atrofia testicular +
<b>Protozoos</b>		
Uretritis, prostatitis, epididimitis debida a	<i>Trichomonas vaginalis</i>	? Controvertido
<b>Hongos</b>		
Balanitis, uretritis (debido a)	<i>Candida albicans</i> y otras especies de <i>Candida</i>	-

*Abreviaturas:* +, demostrada relevancia clínica; -, no relevancia; ?, posible relevancia pero no demostrada.

*Modificada de Ochsendorf, 2008*

Tabla 1.2. Microorganismos y afectación seminal

Microorganismo	Fenómeno	Afectación seminal	Bibliografía
<i>Escherichia coli</i>	Fenómenos de adhesión	Aglutinación de los espermatozoides y disminución de la movilidad espermática (incluso astenozoospermia total). Aparición de vacuolas citoplasmáticas y alteración de la función acrosomal	Keck y col., 1998; Auroux y col., 1991; Monga y Roberts, 1994. Prabha y col., 2010
<i>Enterococcus faecalis</i>	Mediado por hemolisina	Afecta a la concentración y a la morfología de los espermatozoides	Moretti y col., 2009; Mehta y col., 2002
<i>Corynebacterium seminale</i>	Adhesión y generación de biofilm	Reducción de la movilidad	Türk y col., 2007; Türk y col., 2014
<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreción de un factor de inmovilización de probable origen proteico	Aglutinación e inmovilización de los espermatozoides	Ohri y Prabha, 2005; Prabha y col., 2009; Kaur y col., 2010
<i>Gardnerella vaginalis</i>		Alteración concentración, movilidad y morfología espermática	De Francesco y col., 2011
<i>Candida albicans</i>		Disminución de la movilidad de los espermatozoides, fragmentación del ADN, y apoptosis. Efecto negativo sobre la fertilización	Schiefer y col., 1994; Tuttle y col., 1977b
<i>Mycoplasma hominis</i>		Disminución de la concentración, movilidad, morfología. Aumento de la fragmentación del ADN	Gallegos y col., 2008; Gdoura y col., 2007; Gdoura y col., 2008
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Fenómenos de adhesión	Disminución de la concentración, movilidad, morfología (colas enrolladas y acortadas), reducción potencial de oxireducción del eyaculado	Knox y col., 2003; Moretti y col., 2009; Zheng y col., 2008; Fraczek y col., 2007a,b
<i>Chlamydia trachomatis</i>		Aumento del volumen seminal, disminución de la concentración y la movilidad.	Al-Mously y col., 2009



Ahora bien la detección de bacterias en el eyaculado espermático (bacteriospermia) puede representar contaminación de la muestra analizada, colonización (bacteriospermia no patógena) o ITREM (bacteriospermia patógena). Esto se debe a las circunstancias que envuelven la recogida de la muestra y a la colonización del orificio uretral. Pero la realidad es que los hombres asintomáticos con bacteriospermia y sin leucocitospermia, presentan un incremento en la FDE sin alteración de la concentración, motilidad y morfología espermática, lo cual no se reconoce en el análisis citológico del semen (Domes y *col.*, 2012). Además, en los hombres con bacteriospermia hay un incremento significativo de la apoptosis (cromatina marginal, vacuolas translucidas citoplasmáticas, mitocondrias mal ensambladas) y de la necrosis (membrana plasmática rota, reacción acrosómica o acrosoma ausente, núcleos deformados con cromatina desorganizada, axonema alterado, alteración de las estructuras del citoesqueleto (periaxonemal), pero no de la inmadurez (acrosoma alterado, núcleo deformado, redondo o elíptico con cromatina descondensada y presencia de gota citoplasmática) (Moretti y *col.*, 2009).

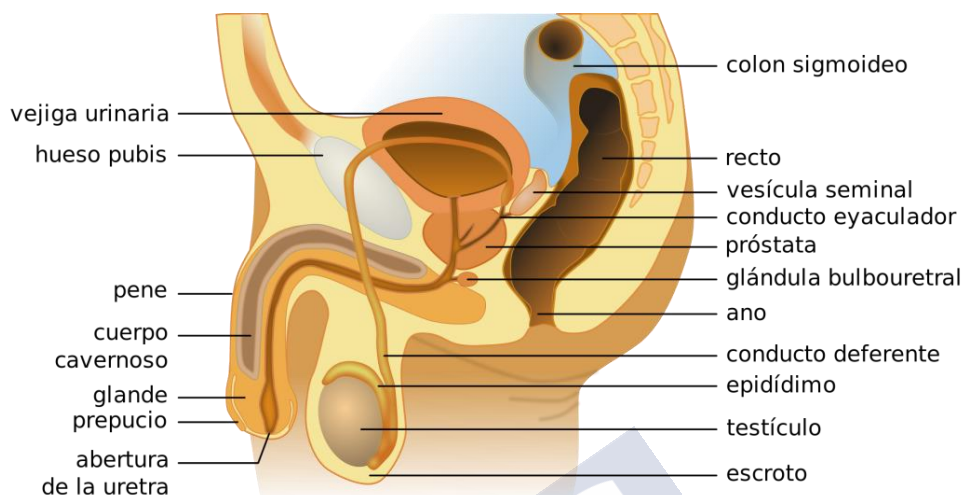
Según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, *World Health Organization*, 1992) la infección seminal queda definida por los siguientes parámetros:

- a. Concentración de bacterias en el eyaculado superior a  $10^3$  UFC/mL.
- b. Detección de *Neisseria gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *Mycoplasma spp.* o *Ureaplasma urealyticum*.
- c. Leucocitospermia significativa:  $\geq 10^6$  leucocitos peroxidasa positivos/mL.

Ahora bien, no sólo será importante conseguir el embarazo, sino que este se produzca sin anomalías en el embrión y consecuentemente en el feto.

## 1.1 APARATO GENITOURINARIO MASCULINO

El aparato reproductor masculino está formado por varios órganos con funciones diferentes (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Sistema reproductor masculino.**

Descripción de las distintas partes anatómicas del aparato genital masculino.  
Drawing of the Male Internal Sexual Anatomy. *Permiso CC-BY-SA-3.0-migrated.*

### 1.1.1 Testículos

Los testículos son dos glándulas con función endocrina reguladora en los que tiene lugar la formación de los espermatozoides a nivel de los llamados túbulos seminíferos.

Se localizan en la región perineal, tras la base del pene, en el interior de la bolsa escrotal quedando conectados mediante el ducto eferente a sus correspondientes epidídimos.

### 1.1.2 Vías seminales

Están constituidas por una serie de conductos que, a partir de los túbulos seminíferos, conducen los espermatozoides hasta los vasos eferentes y el epidídimo donde se almacenan. En esta última localización, los espermatozoides se diferencian morfológicamente, se concentran y adquieren movilidad permaneciendo hasta 42 días tras los que, si no han sido evacuados por eyaculación, son destruidos.

Gracias a las contracciones generadas durante el orgasmo los espermatozoides son transportados desde la cola del epidídimo hasta

el conducto deferente y conducto eyaculador que a través de la próstata desemboca en la uretra.

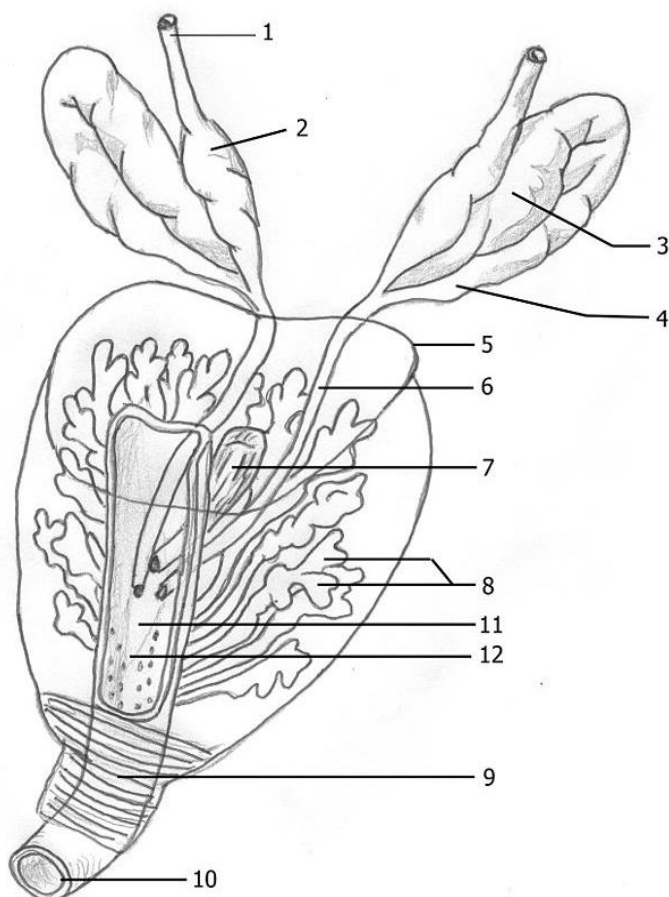
### **1.1.3 Glándulas accesorias**

Están constituidas por las vesículas seminales, la próstata, las glándulas bulbouretrales de Cowper y las glándulas uretrales de Littre. El líquido de las glándulas accesorias constituye el 80% del volumen del eyaculado y contiene nutrientes y componentes reguladores para la función reproductora del espermatozoide (Figura 1.2).

## **1.2 TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DEL SEMEN PARA USO EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA**

Para que los espermatozoides no pierdan funcionalidad, deben ser separados del plasma seminal rápida y eficazmente. La exposición prolongada al plasma seminal disminuye marcadamente la movilidad y la vitalidad y puede disminuir de forma permanente la capacidad fecundante de los espermatozoides. Por ello, es esencial que los espermatozoides que se utilicen para las distintas TRHA sean separados del plasma seminal lo antes posible tras la eyaculación (antes de 1 hora) (Mortimer, 2000).

Por otro lado, el semen no es un fluido estéril y se ha demostrado que a menudo contiene microorganismos (Cottell y *col.*, 1997) los cuales afectan a muchas propiedades de los cultivos y consecuentemente al crecimiento celular, cambios de pH, el agotamiento de sustratos celulares, la inducción de estrés oxidativo, afectación en la producción de amoníaco, secreción de otros metabolitos dañinos, y la modificación del ADN, ARN y la síntesis de proteínas, además de provocar agotamiento de aminoácidos específicos, incluyendo arginina, glutamina y ácido glutámico (Smith, 1960).



**Figura 1.2. Glándulas accesorias.**

Descripción de las distintas glándulas del aparato genital masculino. 1. Conducto deferente. 2. Ampolla del conducto deferente. 3. Vesícula seminal. 4. Conducto excretor de la vesícula seminal. 5. Contorno de la próstata. 6. Conducto eyaculador. 7. Utrícula prostática. 8. Sustancia glandular. 9. Esfínter de la uretra. 10. Uretra. 11. Colículo seminal. 12. Cresta uretral. *Raziel: Prostate et vesicules seminales. Permiso: CC BY 2.5.*

No se puede asumir que simplemente porque no se observen contaminantes microbianos durante la evaluación de los cultivos embrionarios, no existan microorganismos presentes en los mismos, y que consecuentemente no afecten a los resultados de FIV. Los microorganismos pueden estar presentes a niveles que son

indetectables a través de los microscopios de baja potencia utilizados para el cultivo de embriones de rutina. Algunos microorganismos pueden estar en concentraciones bajas, en ambientes de cultivo pobres, donde el crecimiento es lo suficientemente lento como para alcanzar rara vez los niveles que provocan floculación visible del medio de cultivo. Es posible también que lo que se atribuye a menudo como variabilidad del paciente en cuanto a la calidad embrionaria observada, pueda ser en parte debido a la variación de la microbiota en cada paciente y la contaminación no manifiesta posterior. Es probable que muchos cultivos embrionarios de FIV estén contaminados con bacterias o virus que afectan al cultivo de los embriones, pero no producen ningunos signos manifiestos tales como floculación o bloqueo de los embriones.

La casi totalidad de los medios utilizados en la FIV contienen antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. En el pasado, estos antibióticos eran a menudo penicilina y estreptomycin, pero debido a la corta vida media de la penicilina a 37° C (menos de 2 horas), la mayoría de los medios ahora contienen una forma estable de gentamicina. Además la penicilina no afecta a los micoplasmas, ya que estas bacterias submicroscópicas (0,15-0,8 µm) no tienen pared celular y su pequeño tamaño les permite pasar a través de los filtros esterilizantes de 0,22 µm. En cambio son susceptibles a la gentamicina, pero a una concentración 20 veces superior a la que normalmente se utiliza en los medios de cultivo. Los efectos de los micoplasmas sobre los embriones podrían ocurrir sin ninguna otra manifestación, o puede ir acompañado de fragmentación del embrión, formación de vacuolas, mala calidad embrionaria u otros signos más patentes como bloqueo embrionario.

Por todo ello, precisamos de técnicas que separen los espermatozoides del plasma seminal y que por otro lado intenten reducir en la medida de lo posible la posible contaminación microbiana de las muestras de semen. En términos generales, las tres técnicas básicas más utilizadas para la separación de los espermatozoides del semen son:

### **1.2.1 Dilución simple y lavado.**

Se ha demostrado que la dilución simple del semen con medio de cultivo para realizar un simple lavado y posterior centrifugación del diluido, concentrando los espermatozoides, eliminando la mayor parte del sobrenadante y resuspendiendo el pellet en una cantidad de medio de cultivo apropiado según el uso final, puede inducir daños severos a los espermatozoides como resultado de la formación de radicales libres de oxígeno durante los pasos de centrifugación para el lavado. Además, al ser un simple lavado, cualquier célula, detritus o espermatozoides inmóviles no son eliminados y se mantienen en la muestra preparada generando oxidación de la membrana espermática y fragmentación del ADN.

### **1.2.2 Migración espermática (*swim-up*).**

Es un método basado en la capacidad de los espermatozoides para migrar fuera del plasma seminal hacia un medio de cultivo, lo que se conoce como técnica de “*swim-up*”. La técnica puede realizarse colocando el medio de cultivo directamente sobre el semen licuado o colocando el semen licuado por debajo del medio de cultivo, para que los espermatozoides móviles nadan hacia el medio de cultivo. La selección se realiza en base a la movilidad de los espermatozoides.

### **1.2.3 Procedimientos de lavado selectivo: gradientes de densidad.**

Este método utiliza la centrifugación del plasma seminal a través de gradientes de densidad que consisten en partículas coloidales de sílice recubiertas de silano, las cuales separan a las células por su densidad. Además, los espermatozoides móviles nadan activamente a través del material del gradiente para formar un pellet blanquecino en el fondo del tubo. El método simple de preparación en dos pasos de gradientes de densidad discontinuos es el más ampliamente utilizado, típicamente con una capa superior de densidad del 40-50% (v/v) y una inferior de densidad del 80-90% (v/v). La preparación de los espermatozoides utilizando este método resulta en la obtención de una fracción de espermatozoides de muy buena movilidad, libre de

detritus, leucocitos contaminantes, bacterias, células no germinales y células germinales degeneradas, el llamado REM (Recuperación de Espermatozoides Móviles).

Existen evidencias recientes que demuestran de forma concluyente que la población de espermatozoides separados utilizando gradientes de densidad son, no sólo mucho más funcionales en términos de capacidad fecundante, sino que también tienen menor grado de fragmentación de su ADN (González-Marín y *col.*, 2012). Consecuentemente, el método de gradientes de densidad es el recomendado para todas las aplicaciones clínicas.

La eficacia de los métodos de preparación frecuentemente se valora en términos de espermatozoides móviles progresivos recuperados (el llamado REM) y, por tanto, de su capacidad de fecundación.

### **1.3 CAUSAS DE ESTERILIDAD Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (CRITERIOS DE LA URHA-CHUS)**

#### **1.3.1 Inseminación Artificial (IA)**

Todas las formas de IA requieren que las inseminaciones se realicen durante el periodo periovulatorio a mitad de ciclo, e idealmente inseminando los espermatozoides justo antes de la ovulación. Existen numerosos procedimientos para el seguimiento de los ciclos y programar las inseminaciones, que van desde la historia menstrual diaria ( $T^a$  basal corporal), a la combinación de pruebas endocrinas (estradiol, hormona luteinizante, progesterona) con seguimiento del crecimiento folicular mediante ecografía. Además, a menudo se utiliza la estimulación ovárica controlada (con menos dosis hormonales que para los protocolos de hiperestimulación ovárica controlada en Fecundación In Vitro, FIV) para aumentar las probabilidades de embarazo. Una vez preparada y estimulada la paciente, el varón recoge una muestra de semen de la cual hay que seleccionar la mayor cantidad de espermatozoides progresivos para ser inseminados. La vía de inseminación puede ser tanto cervical (justo en el canal cervical o alrededor de su zona externa) como uterina. Esta

última es la que alcanza mayores tasas de éxito por intento al evitar una posible incompatibilidad entre los espermatozoides y el moco cervical ("hostilidad cervical"), y facilitar el transporte obviando la primera barrera a la migración del espermatozoide, el cérvix.

La IA se usa en varias indicaciones clínicas, tanto con el propio semen de la pareja (IA homóloga, IA de Cónyuge o IAC) como con semen de donante (IA heteróloga, IA de donante o IAD) y en mujeres < 38 años.

#### 1.3.1.1 Las indicaciones generales para la IAC incluyen:

##### *1.3.1.1.1 Masculinas:*

- a) Disfunción eréctil o imposibilidad de depósito del semen.
- b) Aneyaculación.
- c) Eyaculación retrógrada.
- d) Hemiplejia o paraplejia.
- e) Reducción del riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, como por ejemplo hepatitis, SIDA (tras lavado seminal).
- f) Alteraciones seminales leves o moderadas.

##### *1.3.1.1.2 Femeninas:*

- a) Factor ovulatorio.
- b) Endometriosis grado I-II.
- c) Factor cervical (moco hostil).

##### *1.3.1.1.3 Factor mixto:*

- a) Esterilidad de origen desconocido (EOD).
- b) Factor inmunológico.

#### 1.3.1.2 Las indicaciones generales para las IAD incluyen:

- a) Oligozoospermia severa o azoospermia.
- b) Evitar la transmisión de desórdenes hereditarios, en casos de enfermedad genética del varón no susceptible de ser estudiada



pre-transferencia embrionaria, o no aceptación de diagnóstico genético preimplantacional.

- c) Evitar la transmisión de enfermedades infecciosas, como la hepatitis, SIDA; en caso de no aceptar las técnicas de lavado seminal.
- d) Casos dónde no haya un compañero masculino, como mujeres lesbianas o mujeres solteras.
- e) Incompatibilidad Rh con isoinmunización previa.

### 1.3.2 FIV

La FIV consiste en la fecundación en el laboratorio de los óvulos para la obtención de embriones que posteriormente son transferidos al útero.

Un ciclo de tratamiento de FIV implica la estimulación ovárica de la mujer (hiperestimulación ovárica controlada) usando hormonas gonadotróficas, en la actualidad generalmente FSH humana recombinante (hormona folículo estimulante) usada en combinación con GnRH agonistas o antagonistas (Hormona liberadora de gonadotropina), para bloquear su propio eje hipotalámico-pituitario-gonadal. El crecimiento folicular se controla usando una combinación de técnicas de ultrasonido y control endocrino (estradiol, progesterona). Después de varios días de estimulación con FSH, se administra coriogonadotrofina alfa que tiene efecto LH (Hormona Luteinizante) para disparar las etapas finales de maduración de los ovocitos y la recuperación de los mismos, mediante la llamada recogida de ovocitos o punción folicular, la cual se programa unas 35-36 horas más tarde.

Los ovocitos recogidos se cultivan durante unas horas antes de la inseminación directamente en la placa de cultivo. Los óvulos fecundados o cigotos son transferidos a un medio de cultivo fresco para realizar el “cleavage” (división celular) formándose los embriones, los cuales se examinan para evaluar su desarrollo y normalidad morfológica antes de transferirlos o congelarlos normalmente en estadio de 8 células en día 3, o como blastocisto en día 5/6.

La FIV se usa en varias indicaciones clínicas, tanto con el propio semen de la pareja como con semen de donante y en mujeres  $\geq 38$  años.

- a) Fracaso previo de 4 ciclos de tratamiento mediante IAC ó 6 ciclos de tratamiento mediante IAD.
- b) Factor masculino moderado: REM con  $> 1$  millón de espermatozoides progresivos recuperados, sin factor inmunológico.
- c) Factor tuboperitoneal determinante de la esterilidad.

### 1.3.3 ICSI

En aquellos casos dónde se espera que la disfunción espermática perjudique severamente o impida la fertilización por medio de la inseminación de ovocitos mediante FIV clásica, la fertilización puede realizarse, usando la fertilización asistida mecánicamente, la ICSI (*IntraCytoplasmic Sperm Injection*) o inyección espermática intracitoplasmática en la que un sólo espermatozoide individual es inyectado directamente en el citoplasma del ovocito en metafase II.

Para maximizar las posibilidades de generar un embrión normal, se deben utilizar espermatozoides con ADN intacto, morfológicamente normales, y evitar cualquier posible exposición de los mismos a condiciones que podrían generar radicales libres como la presencia de leucocitos polimorfonucleares o de microorganismos.

Las indicaciones para la ICSI son:

- a) Factor masculino severo:
  - a. Semen fresco:
    - i. Oligozoospermia severa: REM  $< 1$  millón de espermatozoides progresivos totales, ó
    - ii. Astenozoospermia severa:  $< 10\%$  espermatozoides con movilidad progresiva, ó
    - iii. Teratozoospermia severa:  $< 3\%$  de formas normales.
  - b) Azoospermia: se utilizan espermatozoides obtenidos del epidídimo o del testículo.

- c) Esterilidad de causa inmunitaria: >50% espermatozoides unidos en fresco en el MAR test o >20% en el REM.
- d) Sémenes valiosos: defunción, semen criopreservado por tratamientos antineoplásicos previos.
- e) Imposibilidad de recoger la muestra, realizando biopsia de testículo o aspiración de epidídimo.
- f) Fallo de fecundación previo en FIV.
- g) Fallo de gestación en inseminación artificial.
- h) Diagnóstico Genético Preimplantacional para enfermedades monogénicas o estructurales.
- i) Maduración in vitro de ovocitos inmaduros.
- j) Mala calidad ovocitaria.
- k) Congelación-descongelación de óvulos.

#### **1.4 MICROORGANISMOS ASOCIADOS A ITREM**

En la tabla 1.3 se recogen los principales microorganismos descritos en las patologías que afectan al tracto genitourinario. Algunos de ellos pueden comportarse como saprófitos o patógenos dependiendo de los factores de virulencia, respuesta inmunitaria del hospedador o carga bacteriana, entre otros. Muchos de ellos pueden producir infecciones asintomáticas. Por todo ello, a lo largo del texto se hablará de ITREM para referirse a la presencia de microorganismos en el tracto urogenital masculino sin que ello se asocie necesariamente a clínica infecciosa.

Tabla 1.3. Agentes infecciosos que causan ITREM

Cuadro clínico	Agentes	Agentes de transmisión sexual
Balanitis	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> Herpes simplex virus I y II <i>Candida spp.</i> <i>Trichomonas vaginalis</i>
Uretritis	<i>Enterobacteriaceae spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i> Anaerobios	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> Herpes simplex virus I y II <i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Mycoplasma hominis/genitalium</i>
Prostatitis aguda	<i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Absceso prostático	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>enterobacterias</i> <i>Staphylococcus spp.</i> Anaerobios	<i>Candida spp.</i>
Prostatitis crónica	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Candida spp.</i> <i>Trichomonas vaginalis</i>
Epididimitis	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>
Orquitis	<i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Brucella spp.</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Rubulavirus</i>	<i>Treponema pallidum</i>

### 1.4.1 Bacterias

#### 1.4.1.1 Aerobias

##### 1.4.1.1.1. Gram positivas

*Enterococcus faecalis*, seguida de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* son las más frecuentemente asociadas a infección urinaria. A pesar de que el *Staphylococcus epidermidis* también se recupera con frecuencia, solo una bacteriuria significativa en dos cultivos consecutivos se asocia a diagnóstico de infección. Entre los bacilos gram positivos se aísla con cierta frecuencia *Corynebacterium spp.* pero solo algunas especies como *Corynebacterium urealyticum* o *Corynebacterium seminale* son patógenas. *Streptococcus pyogenes*, aunque poco habitual, también se ha descrito en balanitis y uretritis (Orden y Martínez, 2000).

*Gardnerella vaginalis* es bacilo gram variable raramente aislado del tracto urogenital masculino pero que puede causar patología.

##### 1.4.1.1.2. Gram negativas

Las más habituales son las enterobacterias dentro de las que la más relevante es *E.coli* (más del 80% de los casos) seguida de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*.

También pueden encontrarse bacilos gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* aunque mucho más raramente.

*Neisseria gonorrhoeae* es un diplococo gram negativo, y es un importante patógeno del Tracto Reprodutor Masculino (TREM) siempre asociado a transmisión sexual.

*Haemophilus influenzae* se ha descrito, en contadas ocasiones, como agente etiológico de infección urinaria. Los estudios realizados muestran una incidencia del 0,1%, siendo ésta algo más elevada en población pediátrica. El aislamiento no debe ser subestimado y se debe tener en cuenta su poder patógeno para causar pielonefritis, cistitis aguda, prostatitis, y otras complicaciones (Alcoba y col. 2004).

#### 1.4.1.2. Anaerobias

Saprófitos de la piel y mucosas, suelen considerarse microbiota bacteriana secundaria o de contaminación.

#### 1.4.1.3. Intracelulares

Son transmitidos vía sexual y causan uretritis, epididimitis y orquitis, precisando de tratamiento conjunto de ambos miembros de la pareja. En la mayoría de las ocasiones cursan asintomáticas o con poca sintomatología.

##### 1.4.1.3.1. *Mycoplasmas genitales*

La familia *Mycoplasmataceae* contiene dos géneros que infectan a humanos, *Mycoplasma* y *Ureaplasma* dentro de las que se reconocen las siguientes especies como patógenos humanos: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, y *Ureaplasma urealyticum*. *Ureaplasma parvum* no suele asociarse a clínica en el varón.

La mayoría son saprófitos y solo recuentos superiores a 10.000 UCC (unidades cambiadoras de color)/mL se asocian con infección, excepto *M.genitalium* que es considerado patógeno (Virecoulon y col., 2005).

##### 1.4.1.3.2. *Chlamydia trachomatis*

Es una bacteria gram negativa e inmóvil parásito intracelular obligado de las células eucariotas. Se asocian a ITS los serovares L1 a L3 (linfogranuloma venéreo) y D/Da, E, F, G, H, I7Ia, J, K (enfermedad óculo-genital no invasiva) (Mahony y col., 2003; Galán y col., 2012; Rodríguez-Domínguez y col., 2014).

##### 1.4.1.3.3. *Micobacterias*

*Mycobacterium tuberculosis* puede causar, en raras ocasiones, orquitis, epididimitis y prostatitis con claros signos clínicos.

#### 1.4.2. Hongos

*Candida spp.* (mayoritariamente *Candida albicans*) es el más frecuentemente aislado y se asocia a tratamiento antibiótico previo o transmisión sexual.

### 1.4.3. Protozoos

*Trichomonas vaginalis* es causante de epididimitis, prostatitis y uretritis.

### 1.4.4. Virus

#### 1.4.4.1. Virus del papiloma humano (VPH)

El VPH es un virus ADN bicatenario pequeño sin envuelta con un genoma de unos 8.000 nucleótidos. Es uno de los patógenos más comúnmente transmitidos mediante relaciones sexuales (contacto cutáneo y/o de las mucosas durante las relaciones sexuales), tanto en hombres como en mujeres. Es una causa frecuente de infección de las vías seminales, de transmisión sexual y de serias consecuencias en caso de infección de la pareja femenina debido a su relación con el cáncer de cérvix y a que carece de tratamiento específico.

El VPH es uno de los patógenos más comúnmente transmitidos mediante relaciones sexuales tanto en hombres como en mujeres. Se estima que hasta un 75% de mujeres están expuestas al virus VPH en algún momento de su vida. No obstante, > 90% de las mujeres infectadas son capaces de generar una respuesta inmune eficaz y erradicar la infección en un período de 6 a 24 meses sin sufrir consecuencias a largo plazo para la salud. Una infección con cualquier tipo de VPH puede producir neoplasia intraepitelial cervical aunque esta lesión suele resolverse una vez que desaparece la infección por VPH (Nobbenhuis y col., 2001). Por otro lado, los estudios describen una alta prevalencia de VPH (65% aproximadamente) entre sujetos varones de 18 a 40 años de edad. Para la mayoría de las parejas la detección o no de DNA de VPH específicamente en el semen tiene poca importancia, ya que es prácticamente imposible medir con seguridad el riesgo específico de transmisión desde las diferentes zonas del tracto genital masculino (piel, mucosa, semen). Se cree que la transmisión genital del VPH ocurre principalmente por el contacto cutáneo y/o de las mucosas durante las relaciones sexuales, infectando principalmente células epiteliales y utilizando su maquinaria celular para replicarse. En consonancia con esto, se ha detectado DNA viral

en la mayoría de zonas genitales masculinas, pene, glánde así como en las regiones escrotal, perianal y anal (Grupo de Trabajo VPH, 2007).

Se han identificado más de 118 genotipos de VPH, de los cuales aproximadamente 40 infectan la mucosa anogenital y al menos 18 han sido identificados como oncogénicos dado que inducen cambios cancerosos o precancerosos en la célula (Muñoz y *col.*, 2005; Clifford y *col.*, 2003). De estos, 12 serotipos que son claramente de alto riesgo (16; 18; 31; 33; 35; 39; 45; 51; 52; 56; 58, y 59) y otros 6 (26; 53; 66; 68; 73, y 82) que se clasifican como de «probable» alto riesgo. La infección con algunos tipos de VPH transmitidos sexualmente puede evolucionar y producir lesiones precancerosas y cáncer invasivo, siendo la infección por VPH la causa principal de casi todos los casos de cáncer cervical en nuestro país (Grupo de Trabajo VPH 2007).

Existen tres tipos de vacunas contra el VPH. La vacuna Gardasil 4, también llamada tetravalente, que protege contra 4 serotipos (6, 11, 16 y 18). La vacuna Gardasil 9 que protege contra 9 serotipos (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58). La vacuna Cervarix, también llamada bivalente, que protege contra los serotipos 16 y 18. La bivalente y tetravalente están comercializadas en España, y la Gardasil-9 aunque está autorizada en Europa, no se comercializa todavía en España (DXSP, 2017).

En el SERGAS se incorporó la vacuna bivalente frente al VPH en el calendario de vacunación infantil a finales de 2008 para las niñas nacidas del 1 de enero de 1994 en adelante, incorporándose en el calendario infantil a los 14 años. Esto supuso la necesidad de poner en marcha un sistema de vigilancia que permitiese conocer la evolución de las patologías relacionadas con la infección producida por este virus. Ahora bien, la vacuna bivalente, aunque protege frente a los dos serotipos más cancerígenos, en nuestro medio están involucrados en menos del 60% de los cánceres de cérvix. Por lo tanto, no protege del 40% de cánceres de cérvix en nuestro país (DXSP, 2015).

En Galicia, la prevalencia prevacunal del VPH de alto riesgo era, con datos de 2008 a 2010, del 19 y del 23% en las mujeres de 16-19 y 20-24 años, respectivamente; y la de VPH-16/18 del 10% en ambos casos (DXSP, 2012).



En el 2017 el SERGAS publicó los resultados de la efectividad de la vacunación frente al VPH (DXSP, 2017). Con la introducción de la vacuna se observó un claro descenso en la prevalencia de VPH-16/18 en las mujeres vacunadas (0,8%) respecto a las no vacunadas durante el período postvacunal (9,2%), que se tradujo en una efectividad vacunal directa ajustada del 94% (IC95%: 73-99). Las mujeres vacunadas y no vacunadas presentaron iguales prevalencias de los VPH de alto riesgo no 16-18-31-33-45, lo que avala la comparabilidad de los dos grupos y, por lo tanto, apoya la conclusión de que los resultados son fruto de la vacunación.

La vacuna se aplica a jóvenes entre 9 y 14 años, pero el cáncer de cérvix es excepcional antes de los 30 años. Alcanza su incidencia máxima a los 40-50 años. Esto significa que los supuestos beneficios de la vacunación actual no se recogerán antes de 2030-2035. Por eso, mientras pasan estos años, se hace necesario implementar medidas que disminuyan la exposición al virus en las mujeres sanas.

El VPH es muy difícil de cultivar *in vitro*, y no todos los pacientes infectados por el VPH presentan un título de anticuerpos demostrable. En mujeres, la identificación de cáncer cervicouterino mediante el examen microscópico de las células ha existido desde hace casi 100 años. La citología vaginal para detectar el cáncer de cuello de útero, acreditado con el Dr. George Papanikolau, se inició en la década de 1940. En los países desarrollados en los que se aplican programas de detección de cáncer cervical se utiliza el examen de Pap (prueba de Papanicolaou, o citología vaginal) desde mediados de los años 50 como herramienta principal para detectar síntomas precursores del cáncer cervical. A pesar de que se ha reducido drásticamente la tasa de mortalidad por cáncer cervical en estos países, el examen de Pap requiere que la interpretación la efectúen citopatólogos con gran experiencia y la prueba presenta un relativo nivel de imprecisión con una elevada tasa de falsos negativos. Las anomalías citológicas observadas en el examen de Pap se deben principalmente a la infección por el VPH; no obstante, algunas variaciones inflamatorias o de las muestras pueden dar lugar a falsos positivos de la prueba de Pap. El cribado de un examen de Pap anormal obliga a repetir la prueba, a realizar una colposcopia y una biopsia. Una lesión de grado alto

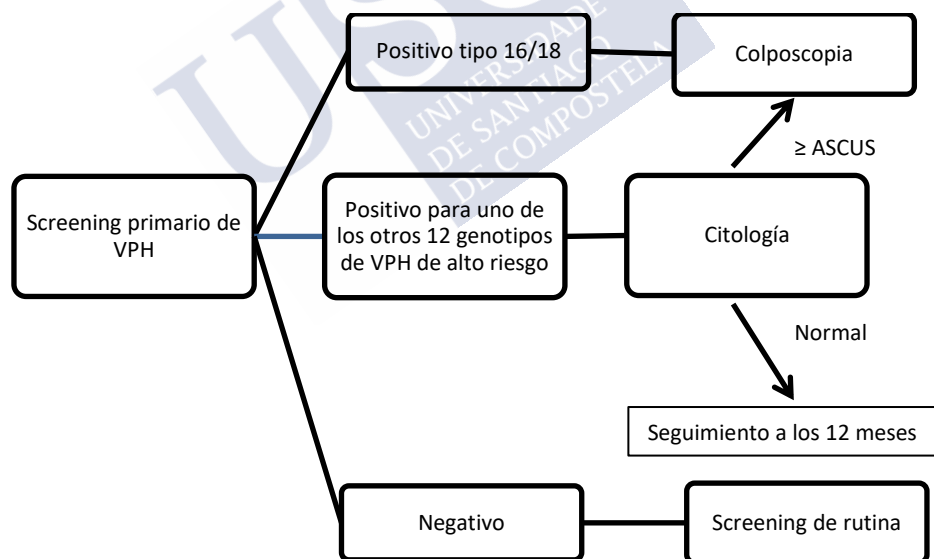
confirmada por histología puede eliminarse mediante cirugía para evitar el desarrollo de un cáncer cervical invasivo.

Hoy en día, los métodos de recogida de muestras cervicales también han cambiado para crear muestras más claras para el examen microscópico a través del uso de la citología de base líquida. Los métodos de detección siguen evolucionando al igual que nuestra comprensión de la causa del cáncer de cuello uterino. Así, las novedosas pruebas del ácido nucleico (ADN) mediante la PCR constituyen un método no invasivo para determinar la presencia de una infección cervical por VPH. La implementación de las pruebas de ADN del VPH han aumentado la eficacia de los programas de detección de cáncer cervical gracias a la detección precoz de lesiones de alto riesgo en mujeres de 30 años en adelante con citología cervical negativa o normal a lesión intraepitelial y a la reducción de las pruebas de colposcopia y tratamientos innecesarios en pacientes de 21 años en adelante con citología ASCUS (células escamosas atípicas de importancia no determinada o *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*). Además, se ha documentado la mayor sensibilidad de la prueba del VPH con relación al examen de Pap para la detección de la enfermedad de alto riesgo en la población cribada (Cuzick y col., 2006; Whitlock y col., 2011). Una vez que se ha establecido la mayor sensibilidad de la prueba de ADN del VPH, se ha propuesto y adoptado la prueba de ADN del VPH como prueba de cribado primario de primera línea para algunos programas de cribado.

Como prueba de ello, en enero de 2016, el American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) tras acumular más de 50 años de apoyo continuo al cribado del VPH desde la introducción de la prueba de citología para tinción de Papanicolaou lo que supuso una constante disminución en la incidencia de cáncer de cuello uterino, publicó el Boletín Práctico número 18 que proporciona apoyo al uso de una nueva prueba para el VPH aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) en el 2014 para la primera línea de cribado de cáncer de cuello uterino en mujeres de 25 años o más como una alternativa a la citología clásica. Ahora bien, si se realiza el cribado con la prueba primaria de VPH, se debe realizar de acuerdo con la guía conjunta de la American Society for Colposcopy and Cervical

Pathology (ASCCP) y Society of Gynecologic Oncology (SGO) publicada en enero de 2016 (Practice Bulletin No. 168 Summary, 2016) y siempre y cuando se siga el algoritmo de la figura 1.3.

El algoritmo de detección de cáncer cervical hace convivir la prueba primaria de VPH con los otros protocolos ya establecidos de cribado y manejo colocando la prueba más sensible, prueba primaria de VPH, primero, seguido de la prueba más específica, el Papanicolaou. Por lo tanto, si la prueba primaria de VPH es negativa, los pacientes acudirán a intervalos de cribado rutinario cada 3 años. Si el paciente tiene una prueba de VPH que es positiva para el VPH genotipo 16 o 18, se refieren directamente a colposcopia para una evaluación adicional. Si el paciente es positivo para uno de los otros 12 genotipos de VPH de alto riesgo, se programa la citología. Y en base a los resultados de la prueba de Papanicolaou, si se muestra ASCUS o superior, se referencia para colposcopia. Si esa prueba de Papanicolaou es normal, no hay seguimiento hasta pasados 12 meses.



**Figura 1.3. Algoritmo de decisión tras prueba primaria de VPH.**

Algoritmo a seguir para el screening primario del VPH. Abreviaturas: VPH, virus del papiloma humano; ASCUS, células escamosas atípicas de importancia no determinada o *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*.

Se mantiene la recomendación de co-prueba para las mujeres 30-65 años al aumentar la especificidad y la sensibilidad del cribado cervical, independientemente de la prueba de VPH utilizada. Si los resultados de la co-prueba son negativos pueden repetirse a intervalos más largos (5 años).

La idea es limitar la referencia directa a colposcopia sólo a aquellos pacientes que son positivos para los genotipos de alto riesgo, los pacientes que están en mayor riesgo de desarrollar lesiones precancerosas de cuello uterino y aquellos con lesiones cancerosas. Así el algoritmo ayuda a prevenir tanto derivaciones innecesarias como el exceso de tratamiento de los pacientes.

El cáncer de cérvix es una patología de la que cada año se detectan 2.500 casos en España y es el cuarto tumor más frecuente en mujeres, después del de mama, colorrectal y pulmón. En más del 80 por ciento de los casos, el VPH, sobre todo los subtipos VPH16 y el VPH18, es el responsable directo de la enfermedad. No obstante, se trata de unos de los tumores cuya prevención primaria y secundaria es posible. Estrategia muy efectiva es la realización de citología cervical, dentro de las revisiones rutinarias ginecológicas, porque detecta alteraciones premalignas, hecho que ha reducido su incidencia en más del 70 por ciento (Grupo de Trabajo VPH, 2007).

Ahora bien, mayor sensibilidad aporta la tipificación viral en ADN del VPH de las células del cuello del útero en estos controles.

Cuando una mujer no ha presentado nunca infección por VPH o tiene pareja estable, entre otras consideraciones, la vacuna no se contempla. De hecho, se estima que el 80 por ciento de las mujeres sexualmente activas contraerá el VPH, pero no todas desarrollarán la enfermedad, la mayoría lo elimina espontáneamente, debido a su sistema inmune. Sólo en una pequeña minoría el virus persiste y puede desembocar en lesión tumoral. En 100 infectadas, un 3 por ciento presentará lesión premaligna. No existen estudios que descifren el delicado equilibrio entre la actividad del virus y el sistema inmune. Mientras tanto, y además de disponer de nuevas terapias, el compromiso pasa por mejorar la detección precoz que se traduce en el desarrollo de pruebas que diagnostiquen en las mujeres la presencia de VPH.

La prevención del cáncer cervical es posible porque desde que aparece una displasia y hasta que deriva en carcinoma invasor puede pasar un mínimo de diez años, lo que pone de manifiesto la utilidad de los programas de cribado.

#### 1.4.4.2. Virus de la hepatitis B, C y Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Se detectan en semen y provocan alteraciones de la espermatogénesis así como de los espermatozoides.

#### 1.4.4.3. Otros virus

Los Virus del Herpes Simplex (VHS), citomegalovirus (CMV), *adenovirus* y *rubulavirus* (virus de la parotiditis) pueden aparecer en altas cantidades en el semen, aunque su asociación con la ITREM es rara.

### 1.5 ITREM: EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO Y EFECTO SOBRE LA FERTILIDAD

#### 1.5.1 Balanitis

La **balanitis** es una inflamación del glande. Si también se inflama el prepucio, se produce una **balanopostitis**, aunque el término balanitis se utiliza a menudo para referirse a ambos casos.

##### 1.5.1.1 Epidemiología

La balanitis es más común en adultos que en niños. Está presente en aproximadamente el 11% de los individuos que acuden por problemas genitourinarios (5,9-14%) (Edwards y *col.*, 2014).

##### 1.5.1.2 Diagnóstico microbiológico

En caso de sospecha de un agente causal de tipo infeccioso, el diagnóstico se realiza mediante el estudio de inoculación directa por contacto del glande o zona sub-prepucial con las placas de cultivo, o bien toma de muestra del glande con un hisopo y posterior cultivo. Se

pueden realizar también técnicas de biología molecular (NAAT, test de amplificación de ácidos nucleicos o *Nucleic Acid Amplification Test*).

Los microorganismos más frecuentes recuperados con significación clínica son *Candida spp.*, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *S.aureus* (Schiefer y col., 1994).

#### 1.5.1.3 Efecto de la balanitis sobre la fertilidad

La balanitis limitada a la afectación cutánea del glande y del prepucio no presenta más relevancia clínica sobre la fertilidad que la posible contaminación de la muestra de semen en su paso por el meato urinario y contacto con la piel del glande o prepucio.

### 1.5.2 Uretritis primaria

La uretritis es una inflamación de la uretra frecuentemente asociada a infecciones de transmisión sexual.

#### 1.5.2.1. Epidemiología

Desde un punto de vista terapéutico y clínico, debemos diferenciar la uretritis gonocócica (causada por *N.gonorrhoeae*) de la uretritis no gonocócica (Consellería de Sanidade, 2014). El término uretritis no específica se aplica a la uretritis no gonocócica no clamidial por lo que para evitar confusiones se debe evitar su uso.

La prevalencia de los microorganismos más comunes asociados con uretritis no gonocócica descritos en los más recientes estudios (Horner y col., 2016) se detallan en la tabla 1.4.

**Tabla 1.4. Prevalencia de los microorganismos más comunes aislados de individuos con uretritis no gonocócicas**

Microorganismo	Prevalencia
<i>C. trachomatis</i>	11-50%
<i>M. genitalium</i>	6-50%
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	5-26%
<i>T. vaginalis</i>	1-20%
<i>Adenovirus</i>	2-4%
<i>Virus Herpes simplex</i>	2-3%

Existe una correlación entre promiscuidad y bajo nivel socioeconómico, y la frecuencia de infecciones por *N.gonorrhoeae* y *C.trachomatis*, las cuales se transmiten por contacto sexual. En Europa central, la uretritis no gonocócica es mucho más frecuente que la gonocócica. La incidencia anual de gonococia comunicada por 28 países de la Unión Europea en 2011 fue de 12,6 casos por 100.000 habitantes (39.179 casos), y la clamidiasis es la ITS más declarada, notificándose el mismo año 346.911 casos, lo que representó una tasa de 175 casos por 100.000 habitantes (Dirección General de Salud Pública, 2017). En el año 2016 se notificaron en España 6.456 casos de infección gonocócica (13,89 por 100.000 habitantes), existiendo una tendencia creciente de la infección gonocócica desde el inicio de la década de 2000 y se mantiene. En ese año se notificaron 7.162 casos de infección por *C.trachomatis*. La tasa para el conjunto de las quince Comunidades Autónomas que disponen de sistema de vigilancia para esta enfermedad fue de 17,85 casos por 100.000 habitantes. (Unidad de vigilancia del VIH y conductas de riesgo, 2018). En Galicia la infección gonocócica es la ITS que sufrió la disminución más espectacular hasta el año 2010 siendo de 2,5 casos por 100.000 habitantes. Ahora bien desde ese año no ha parado de aumentar siendo en el 2017 de 6,5 casos por 100.000 habitantes. No se disponen de datos desglosados de uretritis por *C.trachomatis* (Dirección General de Salud Pública, 2017).

### 1.5.2.2 Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de uretritis se confirma por una cantidad excesiva de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la uretra anterior. Para ello normalmente se investiga en un frotis uretral pero también se puede utilizar la primera fracción de orina (O1). Para diagnosticar uretritis debe darse alguna de las siguientes situaciones (Schiefer, 1998; Marconi y col., 2009; Carne y col., 2012; Horner y col., 2016):

- a. Signos/síntomas clínicos: secreción mucopurulenta o purulenta, alguria, disuria y prurito uretral son síntomas de uretritis. Sin embargo, muchas infecciones de la uretra son asintomáticas.
- b.  $\geq 5$  PMN por campo de 1000x (promediado en 5 campos de elevada concentración) en extensión de muestra uretral, considerándose patognomónico. La observación de diplococos gram negativos intracelulares confirma la infección gonocócica.
- c.  $\geq 15$  PMN por campo de 400x en extensión de sedimento de 3 ml de **O1**, considerándose patognomónico.
- d. Diagnóstico etiológico:
  - i. PCR (reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*) positiva para *C.trachomatis* y/o *N.gonorrhoeae* y/o *Mycoplasma* y/o *Ureaplasma*, en **O1**.
  - ii. Evidencia de *T.vaginalis* en **O1**.
  - iii. Bacterias convencionales relevantes, micoplasmas u hongos (*Candida spp.*) en cantidad  $> 10^3$  UFC/mL en cultivo de **O1**.
  - iv. Bacterias convencionales relevantes, micoplasmas u hongos (*Candida spp.*) en cultivo de **O1** en un número 10 veces superior a las del eyaculado y/o O3. Así bacterias convencionales relevantes, micoplasmas u hongos (*Candida spp.*) en cantidad  $\geq 10^3$  UFC/mL en **O1**, y  $\leq 10^3$  UFC/mL en el eyaculado y/o O3.
- e. Utilizando la técnica de Meares y Stamey, en caso de que el recuento en **O2** exceda al de O1, eyaculado y O3, o bien si existe un recuento elevado en las cuatro muestras (O1, O2,



eyaculado y O3), tendríamos el diagnóstico de infección urinaria (Meares y Stamey, 1968).

En la tabla 1.5 se resumen los métodos disponibles actualmente para la detección de micoplasmas.

### 1.5.2.3. Efecto de la uretritis masculina sobre la fertilidad

#### 1.5.2.3.1 *N.gonorrhoeae* y/o *C.trachomatis*

Existe poca evidencia clínica y patológica que asocie a *N.gonorrhoeae* y/o *C.trachomatis* a esterilidad (Fode y col., 2016). Los estudios son pocos y aunque hay una relación entre estos microorganismos y esterilidad masculina, no llegan a alcanzar la significación estadística, por lo que no existe una evidencia epidemiológica consistente.

*C.trachomatis* puede penetrar en el espermatozoide habiéndose observado en experimentos “in vitro” efectos sobre su movilidad y viabilidad así como sobre la respuesta inmunitaria. Por otro lado, los lipopolisacáridos de *C.trachomatis* pueden contribuir a la FDE y provocar apoptosis (Gonzales y col., 2004; Pacey y Eley, 2004). *C.trachomatis* induce una respuesta inflamatoria en tracto genital masculino y puede afectar a los parámetros espermáticos in vivo (Wolff y col., 1991). Además, la infección se puede transmitir a la pareja femenina pudiendo causar salpingitis crónica con la consecuente esterilidad tubárica. Por todo ello, debería realizarse una prueba directa en el estudio del factor masculino.

Tabla 1.5. Métodos de detección de micoplasmas

Método	Sensibilidad	Especificidad	Ventajas	Desventajas
<b>Cultivo micro-biológico</b>	Alta	Alta	Método recomendado por la Farmacopea Europea. Da un resultado claro.	Requiere un laboratorio de microbiología especializado. Método de detección relativamente lento. Fuente potencial de contaminación cruzada. Algunas cepas no son cultivables.
<b>Tinción directa DNA</b>	Baja	Baja (tinciones DNA no específicas)	Método recomendado por la Farmacopea Europea. Rápida y barata.	La lectura y la interpretación de los resultados puede ser difícil y subjetiva.
<b>Tinción indirecta DNA (utilizando indicadores celulares)</b>	Alta	Baja (tinciones DNA no específicas)	Amplifica contaminante por lo que es más fácil de interpretar que tinción directa.	Más lento y consume más tiempo que la tinción directa.
<b>PCR</b>	Alta	Media (no detecta todas las especies de <i>Mycoplasma</i> )	Rápida y muy sensible. Varios kits comerciales disponibles.	Riesgo de resultados falsos positivos debido a la contaminación por arrastre de los controles positivos y / o muestras.
<b>ELISA</b>	Media (alta si ELISA amplificada)	Media (no detecta todas las especies de <i>Mycoplasma</i> )	Rápida y barata. Útil y simple para probar un gran número de muestras.	Los ELISAs amplificados incluyen pasos adicionales y son más lentos. Requiere lector de ELISA.
<b>Detección bioquímica</b>	Media	Alta	Muy rápida. Útil para las pruebas urgentes de un pequeño número de muestras.	Requiere un luminómetro.

Abreviaturas: PCR, reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*; ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ó *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*. Adaptado de Geraghty y col., 2014

Por otro lado, una complicación de la uretritis no tratada es la epididimitis que sí es causa reconocida de esterilidad masculina. Incluso, se ha demostrado que la infección uretral asintomática puede afectar a la calidad seminal.

#### 1.5.2.3.2 *Ureaplasma spp*

El papel del *U.urealyticum* en la esterilidad masculina ha sido ampliamente discutido.

Los primeros estudios ya fueron contradictorios, no demostrando efectos adversos de los espermatozoides infectados con *Ureaplasma* en los parámetros seminales *in vivo* (Cintron y col., 1981; Shalhoub y col., 1986; Hill y col., 1987), mientras que otros si demostraban una reducción significativa en la concentración (Upadhyaya y col., 1984; Naessens y col., 1986) y motilidad espermática (Naessens y col., 1986). Posteriormente, mientras unos estudios *in vitro* en los que se incubaron espermatozoides frescos con cultivos de *Ureaplasma* no encontraron efectos adversos sobre los espermatozoides (Talkington y col., 1991) otros si demostraron afectación (Rose y col., 1994; Núñez-Calonge y col., 1998). Incluso, más tarde, curiosamente Reichart y col. se encontraron con que los espermatozoides infectados con *Ureaplasmas* *in vitro* presentaron mayores tasas de viabilidad y motilidad que los no infectados (Reichart y col., 2000).

En los estudios realizados con pacientes, Zeighami y col. encontraron que en aquellos con PCR positiva para *Ureaplasma spp.*, el volumen del semen, recuento y morfología de los espermatozoides fue menor que en los que tuvieron la PCR negativa. Al diferenciar entre especies de *Ureaplasma*, el porcentaje de espermatozoides con motilidad y morfología normal, así como el volumen de semen en los hombres con PCR positiva para *U.urealyticum* fueron menores que en los hombres con PCR positiva para *U.parvum*. Además, *U.urealyticum* se encontró en mayor proporción en el semen de los hombres estériles (9%) que en controles sanos (1%). La tasa de detección de *U.parvum* fue del 3% en el grupo estéril y del 2% en los hombres sanos (Zeighami y col., 2009).

#### 1.5.2.3.3 *Mycoplasma spp.*

Se ha demostrado que el *M.genitalium* puede adherirse a los espermatozoides y así ser trasladado al tracto genital femenino (Svenstrup y col., 2003). Su presencia en el semen se ha asociado con una baja concentración de espermatozoides en muestras de semen de hombres estériles (Knox y col., 2003)

La detección de *M.hominis* en el semen se ha asociado con una baja concentración de espermatozoides y una morfología anormal de los mismos. En cambio, los valores medios de volumen seminal, pH, vitalidad, motilidad y recuento de leucocitos no se han relacionado significativamente ni con la detección de micoplasmas genitales ni con la detección de ureaplasmas en muestras de semen (Gdoura y col., 2007).

#### 1.5.2.3.4 *T.vaginalis*

*T.vaginalis* se detecta más frecuentemente en hombres estériles que en controles fértiles, sin embargo, no se ha demostrado ningún efecto sobre la movilidad ni sobre la prueba de interacción moco-espermatozoides (Soper, 2004).

### 1.5.3 Prostatitis

#### 1.5.3.1 Definición

La inflamación de la próstata o prostatitis incluye tanto los casos de origen infeccioso con curso agudo o crónico, como aquellos asépticos, con origen multifactorial, incluidos en lo que se denomina síndrome prostático o síndrome del dolor pélvico crónico (*Chronic Pelvic Pain Syndrome*, CPPS). Su diagnóstico suele ser clínico a partir de los signos y síntomas de inflamación e infección localizada en la próstata (Meares y Stamey, 1968) aunque solo en un 5-10% de los casos suele encontrarse el patógeno responsable (Weidner y col., 1991a).

#### 1.5.3.2 Clasificación de las prostatitis y epidemiología

La clasificación de la prostatitis se estableció por el *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK) y el *National Institutes of Health* (NIH) (Workshop NIDDK, 1995;

Krieger y *col.*, 1999) en la década de los 90 y sigue aplicándose en la práctica clínica y la investigación (tabla 1.6). Se basa en la clínica que presenta el paciente (fiebre, signos sistémicos de inflamación), en la presencia o ausencia de leucocitos en el fluido prostático (FP) y en la presencia o ausencia de bacterias en la misma. Dependiendo de la duración de los síntomas, la prostatitis se clasificará como aguda, o crónica si la sintomatología es de más de 3 meses (Schaeffer, 1999).

**Tabla 1.6. Clasificación de prostatitis de acuerdo al Sistema de Clasificación del NIDDK/NIH**

Categoría	Nombre	Descripción	Síntomas
I	Prostatitis bacteriana aguda	Infección aguda de la glándula prostática	Dolor agudo, síntomas agudos del tracto urinario inferior
II	Prostatitis bacteriana crónica	Infecciones recurrentes de la próstata	Con o sin síntomas, con habitualmente infecciones recurrentes del tracto urinario
III	Prostatitis crónica abacteriana ( <i>Chronic Prostatitis</i> ; CP)/ síndrome del dolor pélvico crónico ( <i>Chronic Pelvic Pain Syndrome</i> ; CPPS)	Infección no demostrada	Dolor pélvico crónico y posibles síntomas miccionales sin infección del tracto urinario
IIIA	CPPS de tipo inflamatorio	Con leucocitos en semen, O3 o FP	
IIIB	CPPS de tipo no inflamatorio	Sin leucocitos en semen, O3 o FP	
IV	Prostatitis asintomática	Detectada por hallazgos casuales en cortes histológicos (biopsia prostática), por elevación del antígeno prostático específico o por la presencia de leucocitos en las secreciones prostáticas durante el estudio de esterilidad	No síntomas subjetivos (no dolor pélvico, posible presencia de síntomas del tracto urinario inferior) pero presencia de leucocitos en semen

Abreviaturas: NIDDK/NIH, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases/National Institute Health. Workshop NIDDK, 1995; Nickel, 1998; Schieffer, 1998; Schaeffer, 2006; Nickel, 2012

Puesto que la evidencia sugiere que, más allá de los uropatógenos, las bacterias consideradas patógenas obligatoriamente, así como los microorganismos oportunistas pueden infectar la próstata, se ha propuesto un sistema de clasificación más comprensivo y etiológico (Schiefer, 1998). Ver tabla 1.7. Además, el diagnóstico en individuos con síndrome de prostatitis se ve obstaculizado por la localización anatómica particular de la próstata que es poco accesible para el examen clínico. Normalmente se basa en exámenes citológicos y microbiológicos de secreciones prostáticas que tienen que pasar la uretra y por lo tanto pueden estar contaminadas por la microbiota uretral normal y/o agentes infecciosos de la uretra.

La prostatitis afecta a 1/22 hombres, o sea al 4,5% de la población masculina (Clemens y col., 2005a y 2007). Aproximadamente un 10% de los hombres que sufren un episodio de prostatitis bacteriana aguda (categoría I) sufrirán prostatitis bacteriana crónica (categoría II), y un 10% progresarán a prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico (categoría IIIa, CP/CPPS) (Yoon y col., 2012).

**Tabla 1.7. Clasificación etiológica del síndrome prostático**

- 
1. Prostatitis bacteriana aguda
  2. Prostatitis bacteriana crónica causada por:
    - a. Patógenos comunes del tracto urinario.
    - b. *U.urealyticum* y *C.trachomatis*.
    - c. *M.tuberculosis*.
  3. Prostatitis micótica.
  4. Uretro-prostatitis causada por:
    - a. *N.gonorrhoeae*.
    - b. *T.vaginalis*.
    - c. *Candida spp*.
  5. Prostatitis crónica de etiología desconocida.
  6. Prostatodinia.
- 

Adaptado de Schiefer, 1998

Los patógenos más frecuentes encontrados en el diagnóstico de prostatitis bacteriana se describen en la tabla 1.8.

Tabla 1.8. Patógenos más frecuentes en las prostatitis

Patógenos etiológicamente reconocidos
<i>E.coli</i>
<i>Klebsiella spp.</i>
<i>P.mirabilis</i>
<i>Enterobacteriaceae spp. distintas de E.coli</i>
<i>E.faecalis</i>
<i>P.aeruginosa</i>
<i>Staphylococci</i>
Microorganismos de importancia discutible
<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Corynebacterium spp.</i>
<i>C.trachomatis</i>
<i>U.urealyticum</i>
<i>M.hominis</i>

Adaptado de Weidner y col., 1991a; Schneider y col., 2003

### 1.5.3.3 Diagnóstico clínico y microbiológico

La infección de las glándulas accesorias masculinas (*Male Accessory Gland Infection, MAGI*) ha sido identificada entre las categorías diagnósticas que tienen un impacto negativo sobre la función reproductiva y la fertilidad en los hombres. De acuerdo con los criterios diagnósticos de la OMS (Rowe y col., 1993), una MAGI se diagnostica cuando los parámetros del semen anormales se encuentran asociados con al menos un factor A más un factor B, un factor A más uno de los factores C, uno de los factores B más un factor de C o dos factores C de los descritos en la Tabla 1.9.

En el presente estudio se aplicaron los criterios diagnósticos de Meares y Stamey (1968) de 4 muestras (O1, O2, secreción prostática y orina post masaje prostático, O3) y no los de la OMS. Alternativamente y de forma aproximativa en una evaluación inicial, se pueden usar 2 muestras, O2 y O3 (Nickel, 1997; Nickel y col., 2006; Magri y Perletti, 2008) ya que detecta el 44% de las prostatitis de categoría II y el 96% de la categoría III (la más habitual). El cultivo aislado de semen no es una muestra recomendable debido a que se

contamina muy fácilmente con la microbiota de la piel o de la uretra durante su recolección lo que dificulta la interpretación de los aislamientos encontrados.

**Tabla 1.9. Infección de las glándulas accesorias masculinas: criterios diagnósticos de la OMS**

<b>Factor</b>	<b>Descripción</b>
A	<i>Historia:</i> positividad para infección urinaria, epididimitis y/o ITS.  <i>Signos físicos:</i> epidídimos blandos o engrosados, vasos deferentes blandos y/o tacto rectal anormal
B	<i>Fluido prostático:</i> fluido prostático u orina anormal tras masaje prostático
C	<i>Signos del eyaculado:</i> leucocitos > 1 millón/mL, cultivo con crecimiento significativo de bacterias patógenas, apariencia anormal, viscosidad aumentada, pH aumentado y/o bioquímica anormal del plasma seminal

Adaptado de Rowe y col., 1993

Para el diagnóstico del “**patrón de prostatitis**” han de cumplirse (Schiefer, 1998; Marconi y col., 2009):

- a. Signos/síntomas clínicos de prostatitis aguda: fiebre (frecuentemente con escalofríos), intenso dolor perineal y de espalda, artralgia, mialgia, y disuria. En el tacto rectal (realizado con mucho cuidado) se demuestra una próstata difusa o irregularmente aumentada, indurada.
- b. Signos/síntomas clínicos de prostatitis crónica. Los síntomas son muy variables en intensidad, normalmente ausentes, y frecuentemente engañosos: fiebre (normalmente de baja intensidad); dolor testicular, peneano, perineal, supra y retropúbico; dolor de espalda, mialgia, artralgia, disuria, ganas de orinar frecuentes y urgentes, hematospermia, disminución de la libido, y dolor en la eyaculación.
- c. Según la técnica de Meares y Stamey, se consideran positivos el líquido prostático o el semen cuando hay patógenos



localizados sólo en el fluido prostático o si la cantidad de patógenos de dicho fluido es  $> 10 \times$  de UFC/mL, que en O1 (uretra) y/o O2. En este estudio al sustituir el líquido prostático por el semen, se considera el semen positivo cuando el recuento de colonias en el **eyaculado o en O3** es  $> 10 \times$  de UFC/mL superior con respecto al recuento de la orina de la primera porción (O1) y/o la segunda porción (O2). Prostatouretritis: si recuento elevado de  $\geq 10^3$  UFC/mL en **O1, eyaculado y O3**.

- a. Hay que tener en cuenta que el cultivo de semen identifica sólo el 50% de las prostatitis crónicas, por lo que la muestra estándar a analizar sería el fluido prostático (Weidner W y col., 2008; Wagenlehner FM y col., 2009; Wagenlehner FM y col., 2013).
- d. PCR positiva para *C.trachomatis* y/o *N.gonorrhoeae* y/o *Mycoplasma* y/o *Ureaplasma*, en el **eyaculado y O3**. En el caso de detectarse en cualquiera de las dos muestras, se consideran agentes etiológicos de ITU inferior sin una localización exacta de la próstata.
- e. Evidencia de *T.vaginalis* en **O3**.
- f. En el caso de sospecha clínica, cultivo de *M.tuberculosis* de la orina de primera hora de la mañana y del eyaculado.

#### 1.5.3.4 Efecto de la prostatitis sobre la fertilidad

La prostatitis puede afectar a la concentración, movilidad, morfología y a la fragmentación del ADN espermático ya que durante la infección/inflamación, el mecanismo de antioxidación del plasma seminal se ve reducido (Giamarellou y col., 1984; Christiansen y col., 1991; Weidner y col., 1991c; Leib y col., 1994; Krieger y col., 1996; González-Marín C, y col., 2012).

La evidencia sugiere que los efectos deletéreos sobre la función espermática atribuidos al estrés oxidativo puede ocurrir tras la eyaculación, una vez que los espermatozoides se exponen al fluido prostático anormal o inflamatorio (Motrich y col., 2006). Los niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ERO) alteran la función espermática tras inducir daño oxidativo sobre las cadenas de ácidos

grasos insaturados de la membrana plasmática espermática y causar fragmentación del ADN (Irvine y col., 2000). También los espermatozoides inmaduros con anomalías morfológicas de cabeza y retención de citoplasma son fuente de ERO (Gil-Guzman y col., 2001). Igualmente, la reacción acrosómica puede verse afectada en estos individuos (Henkel y col., 2006).

Los efectos deletéreos de una prostatitis asintomática sobre la concentración, motilidad y morfología espermática es motivo de debate y difiere en su extensión según los estudios (Pasqualotto y col., 2000; Diemer y col., 2003; Henkel y col., 2006). Ahora bien, el tratamiento antibiótico o antiinflamatorio puede mejorar la movilidad y la vitalidad espermática en hombres con prostatitis (Vicari y Calogero, 2001).

#### **1.5.4 Epididimitis**

La epididimitis es la inflamación del epidídimo. Es casi siempre unilateral y de comienzo relativamente agudo.

##### **1.5.4.1 Epidemiología**

Según el *National Center for Health Statistics* americano, la incidencia en el año 2002 de epididimitis es de 1 de cada 144 hombres de 18 a 50 años que consultan ambulatoriamente (0,69%), lo cual supone unos 600.000 casos al año en los Estados Unidos, siendo la mayoría de ellos en hombres entre 18 y 35 años (Trojian y col., 2009).

La epididimitis es más frecuente que la orquitis, y la orquitis ocurre en el 58% de los individuos diagnosticados de epididimitis (Kaver y col., 1990; Kadish and Bolte, 1998). Además, los procesos inflamatorios del testículo, especialmente la orquitis de origen vírico, suelen afectar al epidídimo.

##### **1.5.4.2 Clasificación y diagnóstico**

La epididimitis se clasifica como un proceso agudo o crónico con arreglo a su aparición y evolución clínica. Aparece una enfermedad crónica con induración en el 15 % de los casos de epididimitis aguda.

Para el diagnóstico de **epididimitis** han de cumplirse (Schiefer, 1998; Marconi y col., 2009):

- a. Signos/síntomas clínicos: hinchazón escrotal dolorosa, frecuentemente asociada con disuria y/o flujo uretral (Becker y col., 1984; Weidner y col., 1987; Schiefer y col., 1994).
- b. Hombres jóvenes con flujo uretral: bacterias convencionales relevantes, micoplasmas u hongos (*Candida spp.*) en cantidad  $\geq 10^4$  UFC/mL en flujo uretral, y  $\geq 10^3$  en **O1** (patrón de uretritis).
- c. Hombres sin flujo uretral: bacterias convencionales relevantes, micoplasmas u hongos (*Candida spp.*) en cantidad  $\leq 10^3$  en **O1** y **O2**,  $\geq 10^4$  UFC/mL en **eyaculado** (se sustituye por la secreción prostática post masaje prostático) y  $\geq 10^3$  en **O3** (patrón de prostatitis).
- d. PCR positiva para *C.trachomatis* y/o *N.gonorrhoeae* en **O1**.
- e. Evidencia de *T.vaginalis*.
- f. *M.tuberculosis* en **O1, O2, eyaculado y O3**.

#### 1.5.4.3 Efecto de la epididimitis sobre la fertilidad

El análisis del eyaculado según los criterios de la OMS, incluido un análisis de leucocitos, puede indicar una actividad inflamatoria persistente. De hecho, varios estudios han demostrado una disminución transitoria del recuento de espermatozoides y la motilidad progresiva, así como alteración de la morfología espermática (Ludwig y Haselberg, 1977; Berger y col., 1979; Berger, 1984; Weidner y col., 1990; Haidl, 1990; Cooper y col., 1990).

La estenosis del conducto epididimario debida a una fuerte inflamación, provoca un descenso del recuento de espermatozoides y, finalmente, si evoluciona puede llegar a provocar azoospermia por obstrucción completa de ambos epidídimos aunque es una complicación infrecuente (Weidner y col., 1990). De aquí se deriva la importancia del tratamiento antibiótico de la epididimitis para prevenir los efectos sobre el transporte de los espermatozoides hacia el exterior (Purvis y Christiansen, 1995).

### 1.5.5 Orquitis

La orquitis es una lesión inflamatoria del testículo asociada frecuentemente con exudado leucocitario dentro y fuera de los túbulos seminíferos que provoca esclerosis de los mismos.

La orquitis aislada es un fenómeno raro, estando generalmente asociada con la infección por el virus de las paperas en niños prepúberes (13 años o menos). Las de origen bacteriano suelen deberse a la extensión por contigüidad de una infección en el epidídimo. También puede ser una complicación de infecciones sistémicas debidas a *Salmonella typhi*, *Brucella spp.*, *M.tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Coxiella burnetii*, y de infecciones víricas causadas por el virus de las paperas, *Mixovirus parotiditis* (familia *Paramyxoviridae*), *echo* y *arbovirus*, virus de la coriomeningitis linfocítica, y de la malaria (Schiefer, 1991; Schiefer y col., 1994).

#### 1.5.5.1 Efecto de la orquitis sobre la fertilidad

En la orquiepididimitis aguda, se produce una disminución transitoria de la concentración y movilidad espermática (Ludwig y Haselberger, 1977; Weidner y col., 1990; Diemer y Desjardins, 1999). Debido a una obstrucción completa de la rete testis, puede aparecer azoospermia obstructiva. En caso de orquitis por paperas puede darse una atrofia testicular bilateral y consecuentemente azoospermia.

## 1.6 MICROORGANISMOS Y TRHA

El lavado de semen es uno de los procesos principales durante la aplicación de las TRHA, como la IIU (inseminación intrauterina, *intrauterin insemination, IUI*), FIV convencional y la ICSI. El objetivo de la preparación seminal es el de obtener la mayor cantidad de espermatozoides con movilidad progresiva y morfológicamente normales, tras la eliminación del plasma seminal, espermatozoides inmóviles/muertos, detritus celulares, células epiteliales, leucocitos, células espermática inmaduras, bacterias y virus presentes. Para ello, como ya se mencionó anteriormente, las dos técnicas que más se utilizan actualmente son la técnica de swim-up y la de gradientes de densidad, siendo ambas igual de efectivas a la hora de eliminar la

contaminación bacteriana de una muestra de semen aunque ninguna de las dos lo consigue de forma absoluta (Abeysondera y col., 2013). Se ha descrito que pueden llegar a eliminar hasta un 95% de las bacterias presentes en el semen (Kuzan y col., 1987, Karlstrom y col., 1991, Nicholson y col., 2000). Se creía que el 5% restante, entre ellas bacterias con tendencia a adherirse a la superficie de los espermatozoides (*E.coli*), podría estar cubierto con la presencia de antibióticos en el medio de cultivo para el lavado de semen, pero se ha demostrado que bacterias como *Ureaplasma spp.*, pueden permanecer adheridas al espermatozoide tras el lavado seminal (Knox y col., 2003) hasta en un 40% de las preparaciones finales tras aplicar la técnica de gradientes de densidad. Por otro lado, los corpúsculos elementales de *C.trachomatis* pueden permanecer adheridos a la superficie extracelular del espermatozoide y en corpúsculos de inclusión dentro del citoplasma de los mismos (Vigil y col., 2002). Como consecuencia, *C.trachomatis* se ha detectado por PCR hasta en un 13% de los sémenes de hombres estériles (Hosseinzadeh y col., 2004; Al-Mously y col., 2009) pudiendo infectar el tracto genital femenino si se inseminan directamente los espermatozoides lavados durante una técnica de IIU o a los ovocitos durante una técnica de FIV o ICSI. Esto, consecuentemente, puede afectar a las tasas de embarazo (Jakus y col., 2008) y a la salud de la mujer y del neonato dado el carácter patógeno de este microorganismo.

La infección por VPH se ha asociado con motilidad reducida del espermatozoide y astenozoospermia idiopática (Schillaci y col., 2013; Foresta y col., 2015). Además, en los pacientes estériles con semen infectado por VPH, hay significativamente más anticuerpos anti-espermatozoides y en estos casos la motilidad aún es más reducida (Garolla y col., 2013).

Otros investigadores han demostrado la inhibición del desarrollo del embrión asociada a la presencia del VPH (Henenberg y col., 2006; Garolla y col., 2016) así como la reducción de las tasas de implantación y embarazo (Spandorfer y col., 2006; Garolla y col., 2016). También, aunque con cierta controversia debida a la variabilidad de los resultados obtenidos por distintos autores, es

posible que el VPH esté asociado a afectos adversos durante el embarazo y mayores tasas de aborto (Perino y *col.*, 2011).

### **1.6.1 Importancia del examen microbiológico del TREM antes de realizar una TRHA**

Los beneficios del tratamiento de las infecciones del TREM detectadas mediante el protocolo de estudio previo a la fecundación son:

- Reducción o erradicación de los microorganismos de las secreciones prostáticas y del semen.
- Mejoría de los signos y síntomas clínicos.
- Prevención de la transmisión.
- Disminución de aparición de posibles complicaciones (esterilidad, dolor crónico).
- Prevención de un potencial daño testicular.
- Normalización de los parámetros inflamatorios (leucocitos) y secretores.
- Mejoría de los parámetros seminales y, por tanto también, la fertilidad.
- Disminución de la posibilidad de contaminación de los cultivos de espermatozoides, óvulos y embriones.

La legislación francesa en su Orden de 3 de agosto de 2010 por la que se modifica el decreto de 11 de abril de 2008 sobre las normas de buenas prácticas clínicas y biológicas de la reproducción asistida, establece en su apartado II que antes de realizar cualquier TRHA debe realizarse un cultivo de semen (JORF n°0211 du 11 septembre 2010 page 16522 texte n° 24). Por otra parte, el consenso adoptado por la Sociedad Francesa de Microbiología fue el de tratar cualquier germen habitualmente patógeno (*N.gonorrhoeae*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *Haemophilus spp.*, *Mycoplasma spp.*, *C.seminale*) independientemente del título, y las bacterias comensales habituales como el *S.epidermidis*, las bacterias transmitidas por la pareja como causantes de vaginosis bacteriana (*G.vaginalis*, anaerobios – *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Actinomyces spp.* –, *Ureaplasma spp.*), *S.agalactiae*,

*Corynebacterium spp.*, y *Eikenella corrodens* si el número es mayor de 1000 UFC/mL (Courcol, 2010). De esta forma también se erradica la infección en la pareja.

En España, en el *REAL DECRETO 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos*, se recoge la realización de cultivo para el uso de cultivos autólogos aunque no hace mención expresa al semen.

Además del tratamiento antibiótico específico frente al microorganismo, también se recomiendan medidas higiénico-dietéticas simples destinadas a disminuir su concentración. Estas consisten en aumentar la frecuencia eyaculatoria asociadas a un consumo diario de por lo menos 1,5 litros de agua/día en los días previos a la recogida de la muestra (Courcol, 2010). Por otro lado, para el tratamiento de la infección de las glándulas accesorias se emplean coadyuvantes de los antibióticos como son los antiinflamatorios no esteroideos (AINE, como el diclofenaco) y, en presencia de leucospermia, antioxidantes para neutralizar los radicales libres generados por los PMN (Courcol, 2010).

Las concentraciones de antibióticos utilizadas en los medios de cultivo son bajas para no interferir con el desarrollo embrionario, por lo que no son útiles para erradicar los microorganismos y prevenir sus efectos nocivos.

Otra opción, ya mencionada anteriormente, es la utilización de los gradientes de densidad para la preparación y selección de los espermatozoides a utilizar en TRHA ya que se consigue retener la mayor parte de los detritus celulares, las células de gran tamaño como los PMN, y ciertos microorganismos. Ahora bien, ciertas bacterias como *E.coli* o *P.mirabilis*, se adhieren a los espermatozoides por lo que el gradiente no consigue eliminarlas, y otras son intracelulares (*C.trachomatis*) por lo que no pueden ser eliminadas por la técnica de preparación del semen (Sun y col., 1987; Henkel and Schill, 1998).

Por ello, los gradientes de densidad se deben utilizar como una última barrera frente a los microorganismos pero no para evitar la realización de un cultivo de semen pre TRHA.

## **1.7 ESTUDIO DEL SEMEN (WHO, 2010)**

El análisis del semen por sí solo, no determina la capacidad para engendrar hijos biológicos ya que no hay propiedades específicas que se puedan medir en toda la población espermática que reflejen específicamente la capacidad fecundante del reducido número de espermatozoides que son capaces de alcanzar el lugar de fecundación (trompas de Falopio). Sin embargo, el análisis del semen puede dar información acerca de problemas en los órganos genitales del varón por lo que es útil en la investigación de esterilidad.

El objetivo del análisis de semen básico es evaluar los parámetros descriptivos de eyaculados obtenidos mediante masturbación. Las cualidades que se evalúan son el aspecto visual, olor, licuefacción, viscosidad, volumen, concentración espermática y número total de espermatozoides, movilidad y vitalidad espermática. También incluye el recuento diferencial según la morfología espermática, la estimación de la aglutinación/agregación, y la evaluación de la presencia de detritus y otros tipos celulares en semen.

### **1.7.1 Examen macroscópico inicial**

#### **1.7.1.1 Licuefacción**

El semen inmediatamente después de la eyaculación es una masa coagulada gracias a proteínas de las vesículas seminales. La licuefacción posterior se consigue gracias a enzimas de origen prostático. Una licuefacción anormal es distinta de una alta viscosidad. La presencia de cuerpos gelatinosos más allá de 60 minutos post eyaculado no tiene ningún significado clínico aunque puede indicar una secreción prostática pobre dado que los enzimas que favorecen la licuefacción provienen de esta glándula. Sin embargo, la presencia de hilos mucosos puede interferir con el análisis seminal.



### 1.7.1.2 Viscosidad

Un semen normal cae gota a gota tras su licuefacción. Si la viscosidad es anormal, las gotas forman "filamentos" cuya longitud es  $> 2$  cm. El incremento de la viscosidad dificulta la movilidad espermática y la separación de los espermatozoides móviles de la masa viscosa.

### 1.7.1.3 Volumen

Al volumen del eyaculado contribuyen fundamentalmente las vesículas seminales y la glándula prostática, con una pequeña cantidad de las glándulas bulbouretrales y epidídimos. La medición precisa del volumen es esencial en cualquier evaluación del semen, ya que permite calcular el número total de espermatozoides y células no espermáticas en el eyaculado.

El volumen bajo (hipospermia) es característico de obstrucción del conducto eyaculador o ausencia bilateral de los conductos deferentes, condición en la cual las vesículas seminales están también pobremente desarrolladas. También puede ser el resultado de problemas durante la recogida (pérdida de una fracción del eyaculado), eyaculación retrógrada o deficiencia androgénica. Si, además se acompaña de oligo o azoospermia y  $\text{pH} > 7,8$  suele deberse a deterioro de las glándulas accesorias por inflamación (Jeyendran, 2000).

El volumen elevado de semen puede reflejar una exudación activa en casos de inflamación activa de los órganos accesorios.

El límite de referencia para el volumen es  $> 1,5$  mL (centil 5, 95% intervalo de confianza 1,4–1,7).

### 1.7.1.4 pH

El pH del semen refleja el balance entre los valores de pH de las diferentes secreciones de las glándulas accesorias, fundamentalmente la secreción alcalina de las vesículas seminales y la secreción ácida prostática. Se acepta como límite de referencia  $\geq 7,2$ .

Un  $\text{pH} < 7,0$  en una muestra de semen con volumen bajo y baja cantidad de espermatozoides, podría indicar obstrucción del conducto

eyaculatorio ausencia bilateral de los conductos deferentes, condición en la cual las vesículas seminales están, también, pobremente desarrolladas (cuadro característico de la fibrosis quística). Si el pH es  $> 9$  con hipospermia puede informar de patología prostática (Jeyendran, 2000).

El pH del semen aumenta con el tiempo ya que el tamponamiento natural disminuye (por descomposición de aminos y amidas), por lo que altos valores de pH facilitan poca información clínica útil.

Las prostatitis crónicas cursan con pH  $< 7,2$ , mientras que las agudas se presentan con pH seminal  $> 8,6$  (Jeyendran, 2000).

### 1.7.2 Examen microscópico inicial

#### 1.7.2.1 Aglutinación y agregación espermática

La *aglutinación* espermática, a consecuencia de anticuerpos antiespermatozoides, significa que los espermatozoides se adhieren entre sí, a menudo por distintas zonas, sin otras células o detritus. La presencia de aglutinación no es suficiente evidencia para deducir una causa de esterilidad inmunológica, pero es sugestiva de la presencia de anticuerpos antiespermatozoides, por lo que se requiere realizar un estudio inmunológico.

Si hay células, detritus y espermatozoides inmóviles incluidos, el aglomerado está causado por *agregación*, no se debe a anticuerpos antiespermatozoide y se registra como agregación. Las aglutinaciones a menudo contienen una cierta proporción de espermatozoides móviles mientras que los agregados, habitualmente, contienen sólo espermatozoides muertos y pueden deberse a una infección de las glándulas sexuales accesorias (Jeyendran, 2000). Estos últimos se encuentran con frecuencia en el semen de hombres normales. Cuando la presencia de agregados o aglutinaciones espermáticas está claramente aumentada, se considera anormal.

#### 1.7.2.2 Otras células distintas a los espermatozoides

- La ausencia de *detritus* es una situación muy rara, algún grado de detritus es típico, pero una contaminación moderada con detritus

no es necesariamente anormal. Abundantes cantidades de detritus son, sin embargo, anormales.

- Las *células epiteliales* del tracto genitourinario (escamosas, cúbicas y transicionales) son habituales en pequeño número en el semen. Su aumento no está relacionado con ninguna alteración funcional específica o presencia de infección (Jeyendran, 2000).
- Las "*células redondas*" se observan a menudo en el semen. Es importante diferenciar si se trata de leucocitos, monocitos/macrófagos, gametos inmaduros, grandes fragmentos celulares (habitualmente sin núcleo) de los túbulos seminíferos del testículo o células de origen prostático. La presencia de PMN o macrófagos puede deberse a una infección de las glándulas accesorias, afectar a la motilidad espermática por el aumento de radicales libres de oxígeno y afectar a la agregación (Jeyendran, 2000).
- Las bacterias y protozoos no se encuentran habitualmente en el semen.

### 1.7.3 Examen microscópico avanzado

#### 1.7.3.1 Evaluación de la movilidad espermática

##### 1.7.3.1.1 Categorías de la movilidad espermática

La movilidad de cada espermatozoide se gradúa como se detalla a continuación:

- Movilidad progresiva (PR): espermatozoides que se mueven activamente, ya sea linealmente o en un gran círculo, sin considerar la velocidad.
- Movilidad no progresiva (NP): todos los demás patrones de movilidad con ausencia de progresión. Por ejemplo, nadando en pequeños círculos, la fuerza flagelar difícilmente desplaza la cabeza, sólo se observa movimiento del flagelo.
- Movilidad total (PR + NP).
- Inmóviles (INM): sin movimiento (pueden estar vivos o muertos).

El límite inferior de referencia para cada una de las categorías es:

- PR: 32% (95% intervalo de confianza 31–34).
- PR + NP: 40% (95% intervalo de confianza 38–42).

Terminología básica:

\* Astenozoospermia:  $(PR+NP) < 40\%$  o  $PR < 32\%$ .

La presencia de astenozoospermia, junto con PMN y gran cantidad de detritus, puede ser indicativo de ITREM (Jeyendran, 2000).

#### 1.7.3.2 Evaluación de la concentración espermática

La concentración espermática se refiere al número de espermatozoides por unidad de volumen de semen (mL) y depende del número de espermatozoides emitidos y del volumen de fluido donde van diluidos.

El límite de referencia inferior para la concentración de espermatozoides es de  $15 \times 10^6$  espermatozoides por mL (95% intervalo de confianza  $12-16 \times 10^6$ ).

El límite de referencia inferior para el número total de espermatozoides en el eyaculado es de  $39 \times 10^6$  (95% intervalo de confianza  $33-46 \times 10^6$ ).

Terminología básica:

\* Azoospermia: ausencia de espermatozoides en el eyaculado centrifugado.

\* Oligozoospermia:  $< 15$  millones/mL ó  $< 39$  millones/eyaculado.

La presencia de azoospermia u oligozoospermia podría deberse a una obstrucción total o parcial epididimaria causada por una epididimitis (Jeyendran, 2000).

#### 1.7.3.3 Morfología espermática

Los espermatozoides consisten en una cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal (cola), pieza terminal. Dado que la pieza terminal es difícil de ver con un microscopio de campo claro, la célula puede considerarse que comprende la cabeza (y cuello), pieza intermedia y cola (pieza principal y pieza terminal).

### *1.7.3.3.1 Método de tinción rápida para evaluación de la morfología espermática*

Los métodos de tinción rápida son particularmente útiles para los laboratorios clínicos que precisan proporcionar los resultados el día del análisis.

El kit de Diff-Quik para tinción rápida es el más utilizado actualmente en los laboratorios.

### *1.7.3.3.2 Valoración de un espermatozoide morfológicamente normal*

Para considerar un espermatozoide normal, tanto la cabeza como la pieza intermedia y la cola deben ser normales. Todas las formas “borderline” (límites o dudosas) deben considerarse anormales.

- La cabeza debe ser lisa (homogénea), de contorno regular y generalmente oval. Debe tener una región acrosómica que comprende el 40-70% del área de la cabeza que no debe contener grandes vacuolas, y no más de dos vacuolas pequeñas, las cuales no deben ocupar más del 20% de la cabeza espermática. La región post-acrosomal no debe contener ninguna vacuola. Respecto al tamaño, la normalidad se encuentra en valores de longitud media de 4,1 micras (3,7 a 4,7 micras, 95% IC) y un ancho medio de 2,8 micras (2,5 a 3,2 micras) y una relación longitud-anchura de 1,5 (1,3 a 1,8).
- La pieza intermedia debe ser delgada, regular y de aproximadamente la misma longitud que la cabeza espermática. El eje mayor de la pieza intermedia debe estar alineado con el eje mayor de la cabeza espermática. La presencia de citoplasma residual sólo se considera una anomalía si está en exceso, por ejemplo, cuando excede  $> 1/3$  del tamaño de la cabeza.
- La pieza principal debe tener un calibre uniforme en toda su longitud, ser más fina que la pieza intermedia, y de aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  de longitud (aproximadamente unas 10 veces la longitud de la cabeza). Puede estar enlazada hacia atrás sobre sí misma, probando que no hay un ángulo agudo indicativo de rotura flagelar.
- Se valoran sólo espermatozoides completos, definidos como aquellos que tienen cabeza, pieza intermedia y cola, dado que sólo se cuentan

espermatozoides completos al valorar la concentración espermática. No se cuentan células germinales inmaduras (células redondas).

- No se valoran espermatozoides superpuestos y aquellos que tienen la cabeza sobre el borde del campo; ya que estos no pueden ser analizados adecuadamente por el sistema automatizado *Sperm Class Analyzer* (SCA<sup>®</sup>, Microptic).

El límite de referencia inferior para las formas normales es de un 4% (95% intervalo de confianza 3,0-4,0%).

Terminología básica:

\* Teratozoospermia: <4% formas normales.

#### *1.7.3.3.3 Valoración de defectos espermáticos específicos (Menkveld, 2010)*

##### *1.7.3.3.3.1 Defectos en los espermatozoides determinados genéticamente (Menkveld, 2010)*

#### *Globozoospermia*

Estos espermatozoides son fácilmente reconocibles por su cabeza de forma redonda y de pequeño tamaño, y la ausencia de acrosoma.

Debido a la ausencia de acrosoma, la cabeza del espermatozoide no contiene acrosina y es incapaz de unirse y penetrar la zona pelúcida. Cuando las parejas son tratadas por ICSI, los embarazos se pueden lograr en algunos casos.

#### *El síndrome de la cola corta*

Los individuos que presentan el síndrome de la cola acortada o en muñón, tienen un pronóstico desalentador, incluso con ICSI, y en los casos en los que se ha conseguido la fertilización, los pronúcleos no se fusionan, y los cigotos no se dividen y, por tanto, se bloquean y degeneran.

Este defecto puede deberse a una defectuosa formación del áster del espermatozoide, singamia y división. Aún cuando el espermatozoide se selecciona cuidadosamente para la ausencia de estas anomalías mediante ICSI y se alcanzan los niveles positivos para la

gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ -HCG, *Human Chorionic Gonadotropin*), los abortos preclínicos son comunes.

*Espermatozoides de cabeza pequeña (microcéfalos)*

Suelen ser espermatozoides de baja vitalidad que no son capaces de producir reacción acrosomal por lo que los resultados de FIV en este tipo de pacientes suelen ser muy pobres.

*Espermatozoides de cabeza grande (macrocéfalos)*

Estos espermatozoides están presentes en eyaculados severamente anormales y biopsias testiculares. Con ICSI se consiguen bajas tasas de fertilización y de embarazo, que puede ser debido a la alta incidencia de aberraciones cromosómicas (aneuploidías) que presentan.

*1.7.3.3.2 Aberraciones de la morfología de los espermatozoides no genéticas (Menkveld, 2010)*

El segundo grupo, con patrones o defectos espermáticos no determinados de forma específica o genéticamente, causados por el medio ambiente u otros factores de estrés, incluyendo la medicación, difiere del grupo con defectos espermáticos permanentes determinados genéticamente, los cuales no responderán a tratamiento. Los defectos en los espermatozoides en este grupo pueden regresar a la normalidad o desaparecen cuando la fuente de las alteraciones o el estrés se eliminan o se trata. Los hombres con este tipo de anormalidades en el semen todavía tienen una buena oportunidad para la concepción in vivo o, alternativamente, un buen pronóstico para la FIV sin ICSI.

*Espermatozoides de cabeza grande*

Las cabezas grandes o macrocéfalas pueden ser causadas por el uso de fármacos, como la sulfasalazina, para el tratamiento de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Cuando se suspende el tratamiento con estos fármacos los parámetros del semen revierten a valores normales aunque no está claro si la capacidad fertilizante es completa.

### *Espermatozoides elongados*

La elongación es generalmente reconocida como una aberración morfológica espermática inducido por estrés, y es frecuente sobre todo en la infección de las glándulas accesorias masculinas y en presencia de un varicocele. La forma clásica de “*tapering*” o estrecha/delgada ha sido descrita como una cabeza espermática de más de 5 micras de longitud, con una anchura inferior a 3 micras o una longitud de menos de 5 micras y con una anchura inferior a 2 micras. La cabeza piriforme es también incluida bajo la denominación de alargamiento de los espermatozoides. El alargamiento de los espermatozoides se acompaña de graves anomalías estructurales, así como daños en el ADN. El aumento de la longitud de la cabeza espermática resulta de una elongación anormal del núcleo, el cual también presenta capas membranosas entre los límites exterior e interior de la envoltura nuclear. Las anomalías nucleares espermáticas también se asocian con anomalías de la región del cuello, la persistencia de material citoplásmico residual y una mayor frecuencia de aneuploidías cromosómicas, junto con deterioro de la compactación de la cromatina, posiblemente a causa de la no disyunción meiótica durante la espermatogénesis. También se ha encontrado una baja tasa de fertilización mediante ICSI. Sin embargo, cuando se trata la infección con antibióticos a largo plazo o el varicocele se trata con una varicocelectomía, las características del semen, incluyendo la morfología espermática, puede mejorar y los embarazos llegar. En caso de varicocelectomías, en las cuales no se observa una mejoría sustancial de la calidad del semen, los embarazos aún pueden ocurrir por la mejoría de la calidad del ADN espermático debido a la reducción de la producción de radicales libres de oxígeno tras la varicocelectomía.

### *Residuos citoplasmáticos*

La presencia de residuos citoplasmáticos está asociada con inmadurez de espermatozoides y sobre todo con la producción de radicales libres de oxígeno con el consecuente daño del ADN. En estos casos se ha observado una disminución de las tasas de embarazo.



#### 1.7.3.4 Vitalidad

Si la proporción de espermatozoides móviles es <40%, debe determinarse la proporción de espermatozoides vivos con objeto de diferenciar entre muertos y vivos inmóviles. Esta diferencia sólo tiene interés clínico cuando hay muy pocos o ningún espermatozoide móvil.

Se han descrito una gran variedad de métodos de tinción supravitales, basados en la exclusión de determinados colorantes por las células vivas que se pueden valorar usando, tanto microscopía óptica (ej. eosina, trypan blue) como microscopía de fluorescencia (ej. Hoechst 33258 y 33342, ioduro de propidio). Además, debido a que el espermatozoide intacto puede regularse osmóticamente, su capacidad para hincharse por estrés hipotónico controlado también ha sido descrito como método para evaluar la Vitalidad Espermática –test hipo-osmótico, o “HOS Test, *Hyposmotic Swelling Test*”.

La presencia de una gran proporción de células vitales pero inmóviles, puede indicar defectos en la ultraestructura del flagelo, como por ejemplo el síndrome de Kartagener (“síndrome de cilios inmóviles”). Además, un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles y no viables (necrozoospermia) puede ser indicativo de patología epididimaria o de afectación de los microorganismos a la integridad de la membrana espermática (Jeyendran, 2000).

El límite de referencia inferior para la vitalidad (espermatozoides con membrana intacta) es 58% (95% intervalo de confianza 55–63).

#### 1.7.3.5 Leucocitos en las muestras de orina/semen/fluido prostático

Es habitual que un incremento de los leucocitos en el semen se interprete como infección y, consecuentemente se trate innecesariamente con antibióticos cuando, actualmente, el único tratamiento que parece efectivo frente a la leucocitospermia son los fármacos antiinflamatorios (Virecoulon y col., 2005).

En el análisis de semen se considerará que existe un proceso inflamatorio sí:

- a. Leucocitos peroxidada positivos (PMN):  $\geq 1 \times 10^6/\text{mL}$ , basado en los criterios de la WHO y/o
- b. Elastasa  $\geq 230 \text{ ng/mL}$  (WHO, 2010).

La prevalencia y el significado clínico de los leucocitos en el semen es actualmente motivo de controversia ya que puede detectarse en hombres con sintomatología de ITREM pero también ocasionalmente en hombres asintomáticos.

Las células inflamatorias (PMN y macrófagos fundamentalmente) generan radicales libres de oxígeno que inducen estrés oxidativo al superar la capacidad antioxidante del semen. Estos radicales alteran la membrana espermática por peroxidación de los lípidos, produciendo externalización de fosfatidil serina (van Engeland y *col.* 1998) tras apoptosis, provocando el enrollamiento de la cola y, consecuentemente astenozoospermia (Fraczek y *col.*, 2007a,b) y disminuyendo la capacidad del espermatozoide para fusionarse al ovocito (Tremellen, 2008). Además, inducen FDE manifestándose sus consecuencias en el desarrollo embrionario tardío (Aitken y De Iuliis, 2007).

La prevalencia de leucospermia ( $\geq 1 \times 10^6$  PMN/mL) en hombres estériles varía del 7 al 38% según el país del estudio (Keck y *col.*, 1998). La mayoría de los leucocitos en el semen provienen del testículo y del epidídimo (Keck y *col.*, 1998). Punab y *col.* (2003) establecieron que el límite definido por la WHO ( $\geq 1 \times 10^6$  leucocitos peroxidasa positivos/mL) tiene una sensibilidad muy baja para discriminar a los individuos con o sin bacteriospermia significativa, y propusieron como límite  $0,2 \times 10^6$  leucocitos PMN/mL, demostrando que los hombres con cantidades mayores a este límite en semen tienen mayor carga microbiana.

El recuento de leucocitos (PMN/mL) debe realizarse en cámaras de recuento tipo Neubauer (Muller y *col.*, 2001; Krieger y *col.*, 2002) o mediante tinciones que permitan referenciar el recuento de PMN al de espermatozoides (Punab y *col.*, 2003).

El interés de reducir la leucospermia se debe a que su presencia en el semen disminuye significativamente la tasa de fecundación y la tasa de división en FIV (Zorn y *col.*, 2003) y en ICSI (Yilmaz y *col.*, 2005), la tasa de embarazo en FIV y de desarrollo hasta el estadio de blastocisto en ICSI (Zorn y *col.*, 2003). El consenso actual considera que la leucospermia nos informa de una inflamación del TREM, y que

debe ser tratada en el caso de manifestarse de forma crónica, especialmente antes de realizar TRHA (Lemkecher y *col.*, 2005). Sin embargo, el tratamiento antibiótico de la leucospermia asintomática es controvertido debido a que su beneficio terapéutico no ha sido probado y los antibióticos pueden causar efectos secundarios (resistencias y otros como alteración de la microbiota o reacciones adversas en el paciente).

### **1.7.4 Estudio inmunológico**

#### **1.7.4.1. Anticuerpos anti-espermatozoides**

La parte secretora de los anticuerpos tipo IgA se une al moco cervical por lo que la presencia de IgA unida a espermatozoides ocasiona una reducción de la capacidad para penetrar el moco cervical. De esta forma, la autoinmunidad a los espermatozoides, puede causar esterilidad bien por bloqueo de la interacción espermamoco cervical, lo que impide el transporte espermático hacia la zona de fecundación a través del tracto reproductor femenino, o bien interviniendo en la interacción espermatozoide-ovocito, e interfiriendo en la propia fertilización (Jeyendran, 2000).

Dependiendo de la naturaleza y de la localización del antígeno espermático y de la concentración de anticuerpos, se pueden observar diferentes efectos:

- \* Aglutinación: si los espermatozoides móviles se adhieren unos a otros cabeza a cabeza, cola a cola o de forma mixta.
- \* Efecto citotóxico: la existencia de anticuerpos, que median un efecto citotóxico, debe sospecharse si la movilidad y vitalidad disminuyen rápidamente en una muestra de semen. Se trata de un fenómeno raro y probablemente necesita altas concentraciones de anticuerpos.
- \* Dificultad de paso a través del moco cervical al estar recubierto de anticuerpos (movimiento en agitación, "*shaking*")
- \* Bloqueo de la unión a la zona pelúcida: deterioro de los eventos de la reacción acrosómica.
- \* Inhibición de la fusión espermatozoide-ovocito.

Los anticuerpos anti-espermatozoides en el semen pertenecen casi exclusivamente a dos clases de inmunoglobulinas, IgA e IgG. Los anticuerpos IgM, debido a su mayor tamaño, rara vez se encuentran en el semen.

*1.7.4.1.1 Prueba directa para la detección de anticuerpos unidos a los espermatozoides: reacción de antiglobulina mixta (Mixed Antiglobulin Reaction, MAR test)*

Actualmente no hay valores de referencia para los anticuerpos unidos a espermatozoides en la prueba MAR para hombres fértiles. En espera de más pruebas, el manual de la WHO 2010 conserva el valor de consenso del 50% de espermatozoides móviles con partículas adheridas como el valor de corte ya que la penetración de los espermatozoides en el moco cervical y la fertilización in vivo se ve alterada significativamente cuando el 50% o más de los espermatozoides móviles tienen anticuerpos unidos a ellos.

## **1.8 INDICACIONES PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SEMEN**

La presencia de microorganismos y sobre todo las infecciones crónicas, pueden alterar la secreción de las glándulas accesorias masculinas. Así, una afectación de las vesículas seminales se traduce en una hipospermia (< 1,5 mL de semen) y pH ácido, mientras que una afectación prostática se traduce en una viscosidad anormalmente elevada del semen y un pH básico (La Vignera y col., 2011). En individuos con epididimitis o uretritis crónicas, se observa una disminución del volumen seminal (Marconi y col., 2009). También, la infección crónica del TREM puede provocar la ruptura de la barrera hematotesticular con la generación consiguiente de anticuerpos antiespermatozoides por la exposición de los espermatozoides al sistema inmunitario propio (Jarow y col., 1990; Meinhardt y Hedger, 2011), los cuales provocan aglutinación de los espermatozoides, astenozoospermia, defectos de migración, y alteración de la fecundación al alterarse la capacidad de fusión con la zona pelúcida del ovocito. Por tales razones, se considera indicado el estudio

microbiológico del semen ante el hallazgo de las siguientes alteraciones:

- 1) Hipospermia y/o  $\text{pH} < 7.0$  ó  $> 8.0$ .
  - a. pH bajo: en infecciones crónicas.
  - b. pH alto: en infecciones agudas.
- 2) Hemospermia: sangre o hematíes en semen.
- 3) Alteraciones de la licuefacción del semen.
- 4) Presencia de PMN en concentración  $\geq 1$  millón/mL en el eyaculado (leucospermia) o aumento de elastasa granulocitaria en líquido seminal.
- 5) Presencia de aglutinación espontánea de los espermatozoides en el eyaculado, que afecte a más del 10% de los mismos.
- 6) Marcada astenozoospermia de etiología desconocida.
- 7) Marcada oligozoospermia (5-10 millones/mL).
- 8) Marcada teratozoospermia ( $< 3\%$ ).
- 9) Descenso de los marcadores bioquímicos prostáticos (fosfatasa ácida total, ácido cítrico y zinc), de vesículas seminales (fructosa) o epididimarios (carnitina). En ocasiones una infección puede causar una disminución considerable de la función secretora, pero a pesar de esto la cantidad total del marcador o los marcadores presentes, todavía pueden estar dentro del amplio margen de normalidad. La infección también puede producir un daño irreversible del epitelio secretor, de modo que incluso después del tratamiento, la capacidad secretora aún será baja.
- 10) Antecedentes de infecciones urogenitales o de las glándulas accesorias con datos actuales de posible infección de la vía seminal.
- 11) Inclusión en programas de Reproducción Asistida, ya que aquí es fundamental que la muestra de semen no contamine los medios de cultivo enriquecidos de nutrientes en los cuales se incuban normalmente los ovocitos y espermatozoides durante una FIV; así como no provocar infecciones iatrogénicas en la pareja durante la realización de inseminación intrauterina.

## **1.9 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**

### **1.9.1 Observación microscópica de la muestra**

#### **1.9.1.1 Examen en fresco**

Puede realizarse en campo claro o mediante contraste de fases. Permite la visualización de estructuras celulares, bacterianas, fúngicas y parasitarias. En combinación con ciertos colorantes como el azul de metileno o el blanco de calcoflúor mejora la sensibilidad y facilita la observación de ciertas estructuras celulares que los captan. Asimismo, es útil para observar la movilidad de células (espermatozoides), bacterias y protozoos (García Martos y *col.*, 1994).

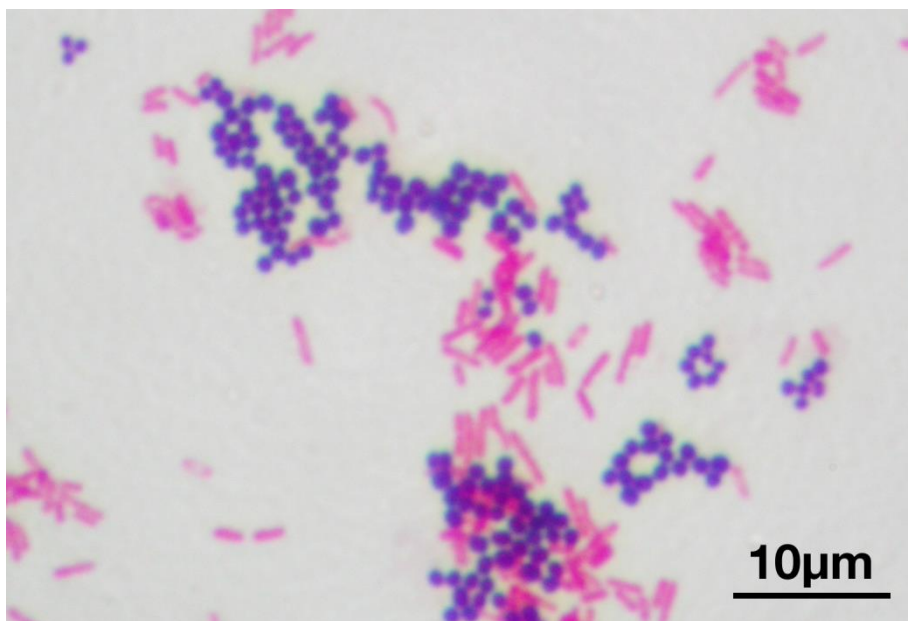
#### **1.9.1.2 Frotis teñidos**

Aunque existen numerosas tinciones que facilitan la observación de los microorganismos al microscopio, la tinción de Gram es la más utilizada. Se trata de una tinción diferencial que permite distinguir entre lo que se conoce como bacterias gram positivas (púrpura) y gram negativas (rosas) en función de las diferencias en composición y estructura de la pared celular de las mismas (Figura 1.3).

### **1.9.2 Cultivo**

#### **1.9.2.1 Cultivo convencional.**

Se basa en el crecimiento de las bacterias en medios de cultivo artificiales que contienen los sustratos necesarios para ello, en condiciones ambientales apropiadas. Se considera convencional cuando las condiciones de siembra e incubación son las habituales de trabajo en los laboratorios de microbiología clínica. Estas permiten recuperar todos aquellos microorganismos sin requerimientos especiales para su aislamiento. Estos medios pueden ser generales, enriquecidos o selectivos (ver Anexo 1).



**Figura 1.4. Tinción de Gram**

*Microscopic image of a Gram stain of mixed Gram-positive cocci (Staphylococcus aureus ATCC 25923, púrpura) and Gram-negative bacilli (Escherichia coli ATCC 11775, rosa). Magnification:1,000. Permiso: CC BY SA 3.0,2.5,2.0,1.0.*

### **1.9.3 Detección de ácidos nucleicos**

El diagnóstico etiológico de las ITREM tiene importancia no sólo por sus implicaciones terapéuticas, sino también por la información epidemiológica que aporta, esencial para el diseño adecuado de medidas preventivas. En los últimos años se han desarrollado técnicas de biología molecular mediante detección y amplificación de ácidos nucleicos de los microorganismos a partir de las muestras de pacientes. Estos nuevos métodos son especialmente útiles en el caso de virus y bacterias con requerimientos especiales, teniendo ventajas notables al suministrar resultados en horas, con especificidad y sensibilidad muy alta (> 90%). Una desventaja respecto a los métodos basados en cultivo es que no permiten diferenciar entre microorganismos vivos y muertos. Por otra parte, la existencia de inhibidores de la amplificación en algunos tipos de muestra, puede ocasionar resultados falsamente negativos. Sin embargo, la

introducción de controles internos permite detectar esta situación. Otra limitación de estos nuevos métodos es su coste económico aunque cada vez su coste es más reducido.

En el caso de microorganismos comensales del TREM se requieren técnicas moleculares cuantitativas para diferenciar entre colonización o infección.

La diana de estos métodos de amplificación son genes de la ATPasa, proteínas específicas del microorganismo, regiones conservadas del gen del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal de 16S (16S ARNr), ARN mensajero, o secuencias repetidas a lo largo del genoma (elementos rep). Según la diana, la sensibilidad del método varía.

Así, los métodos de amplificación son la mejor alternativa para demostrar la presencia de microorganismos en el TREM siendo más sensibles que el cultivo, la hibridación molecular o la detección de antígeno. Permiten obtener resultados en pocas horas, a partir de muestras contaminadas, y no requieren la existencia de microorganismos viables, un problema para el cultivo debido a la labilidad y dificultades de cultivo de algunos microorganismos.



## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Actualmente no existe un consenso claro sobre la necesidad de realizar estudios microbiológicos previos en los pacientes incluidos en los programas de reproducción asistida. Del mismo modo, no hay referencias a cuál sería el protocolo de estudio más adecuado, los criterios microbiológicos que definirían la conveniencia del tratamiento antibiótico o qué esquema terapéutico debería emplearse.

La controversia sobre el papel patógeno de ciertos comensales del tracto urogenital añade más incertidumbre sobre la necesidad de un cribado sistemático y su eficacia sobre los indicadores de fertilidad y el éxito de las TRHA.

La mayoría de los estudios disponibles hasta la fecha coinciden en que la contaminación (infección/colonización) microbiana del semen empleado en las TRHA:

- disminuye su calidad en términos de fertilidad,
- reduce la probabilidad de éxito en la implantación del embrión,
- introduce patógenos potenciales en las vías altas del aparato reproductor femenino,
- puede formar embriones portadores de genomas microbianos con consecuencias desconocidas,
- puede ocasionar complicaciones indeseadas durante la gestación,
- tras el parto, puede producir infección posparto o infección/sepsis neonatal.

### 2.1 HIPÓTESIS

En el paciente varón, el cribado microbiológico de muestras urogenitales previo a los procedimientos de reproducción asistida puede beneficiar de forma global el éxito del procedimiento ya que

permitiría tomar decisiones terapéuticas que permitan la erradicación de los microorganismos presentes en el TREM.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivo general

El objetivo final es disponer de la información suficiente y necesaria para decidir si se debe o no incluir el cribado microbiológico del tracto urogenital masculino en los pacientes que van a someterse a TRHA. En caso afirmativo, deberán establecerse:

1. Los criterios de interpretación en función de los cuales se decidirá la necesidad de erradicar la infección/colonización microbiana del tracto urogenital.
2. Los protocolos de tratamiento antibiótico.

### 2.2.2 Objetivos específicos

- Describir las características de la población a estudio.
- Describir la microbiota encontrada aplicando el protocolo Meares-Stamey modificado y estimar su prevalencia en el año y la población objeto de estudio.
- Estudio de micoplasmas, *C.trachomatis* y *N.gonorrhoeae* (en O1) y estimar su prevalencia en el año y la población objeto de estudio.
- Establecer un protocolo de tratamiento antibiótico que permita la erradicación de la colonización/infección así como valorar su eficacia.
- Estudio de VPH (en semen) y estimar su prevalencia en el año y la población objeto de estudio.
- Análisis descriptivo de los parámetros del seminograma.
- Leucocitos PMN en semen.
- Estudio de las variables de interacción en los datos obtenidos del seminograma.

- Analizar si existe asociación entre la presencia de microorganismos en el TREM y los parámetros estudiados en el análisis seminal,
- Analizar si existe asociación entre la presencia de microorganismos en el TREM y el factor tubárico de esterilidad.
- Relación entre los parámetros del seminograma con significación estadística en los hombres con colonización/infección del TREM y las variables que muestren interacción con los mismos.
- Estudiar si existe asociación entre los microorganismos detectados y la sintomatología clínica evaluada mediante el cuestionario NIH-CPSI versión en español (ya validado en estudios previos) relativo a posibles síntomas de prostatitis.
- Evaluar el impacto del cribado microbiológico en el tipo de técnica de FIV a utilizar para la fecundación de los óvulos.
- Determinar posibles estrategias para la prevención primaria de las colonizaciones/ITREM.



## 3 MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS ITREM EN RHA

#### 3.1.1 Diseño del estudio

##### 3.1.1.1 Pacientes

La atención sanitaria Pública en Galicia en casos de esterilidad se divide en tres zonas. La Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS) presta asistencia sanitaria a una de ellas que engloba a unos 900.000 habitantes. De estos, se estima que alrededor de un 15% en edad de procrear van a consultar por problemas de esterilidad. Sobre esta población se aplicará un muestreo no probabilístico, consecutivo y voluntario durante un año. Se estima que es el período de tiempo suficiente para recabar el mínimo número de pacientes necesario para la relevancia estadística de los resultados además de ser el período de tiempo que se utiliza para el cálculo de indicadores de calidad en este tipo de unidades.

##### 3.1.1.2 Tipo de estudio

Estudio unicéntrico, descriptivo, observacional, transversal analítico, con recogida de datos desde diciembre de 2015 hasta diciembre de 2016 (12 meses).

##### 3.1.1.3 Tamaño de la muestra

La prevalencia de síntomas tipo prostatitis varía según los estudios entre el 2% y el 9,7%, con una media del 8,2% (Clemens y *col.*, 2005a,b; Krieger y *col.*, 2008; Yoon y *col.* 2012). Las posibles razones de esta diferencia de casi 5 veces son su propio diseño, las poblaciones seleccionadas, factores de tipo cultural, genéticos,

estacional, de exposición, y condiciones de riesgo no definidas. Pocos trabajos incluyen un estudio microbiológico adecuado.

Asumiendo una población de 902.780 personas de nuestra Área Sanitaria, de las que 225.942 son varones en edades comprendidas entre 18 y 55 años y 118.239 mujeres en edades comprendidas entre 18 y 39 años (ine, 2018) que es la población potencialmente atendida, un error tipo  $\beta$  del 4,00% en la estimación de una proporción mediante un intervalo de confianza asintótico normal al 95,00% bilateral, con una prevalencia esperada del 8,20%, será necesario incluir 181 varones en el estudio. Estimado un porcentaje de abandonos de alrededor del 5,00%, sería necesario reclutar 190 individuos.

#### 3.1.1.4 Selección de los participantes

Se seleccionaron de forma consecutiva todos aquellos hombres mayores de edad, con plena capacidad de decisión, monógamos con pareja heterosexual estable que hayan acudido a consulta junto con su pareja para un estudio de esterilidad durante un año y que posteriormente firmen el consentimiento informado entregado junto con la hoja de información por parte del doctorando (de acuerdo con los criterios para estudio de esterilidad de la Guía Técnica del Proceso de Reproducción Humana Asistida del Servicio Gallego de Salud - SERGAS- de julio de 2011). Se solicitará la firma del consentimiento de la pareja del participante puesto que se requiere la revisión de la historia clínica de la mujer para completar los datos del estudio y tratamiento en caso de infección/colonización detectada al varón.

##### Criterios de exclusión en el varón:

- > 55 años o vasectomía, de acuerdo con las consideraciones de la cartera básica de servicios del sistema Nacional de Salud (Orden SSI/2065/2014).
- Renuncia a la recogida de las muestras para cultivo a pesar de realizar el cuestionario NIH-CPSI versión castellano.
- Serología positiva para VHB, VHC o VIH ya que se tratan en la unidad de referencia del Hospital Universitario de la Coruña.
- Enfermedad genitourinaria crónica previa (hiperplasia benigna de próstata).
- Tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses.

- Enfermedad sistémica.
- Problemas anatómicos a nivel genitourinario.
- Cirugía urológica previa.
- Exposición a largo plazo a radiaciones ó sustancias nocivas.
- Consumo de fármacos en los últimos 3 meses que afecten a la calidad seminal.
- Fiebre en los 2 meses anteriores.
- Inflamación o infección del tracto urinario en los 2 últimos meses.
- Consumo de inmunosupresores, corticosteroides sistémicos, o quimioterapia en los 3 meses anteriores.
- Historia previa de biopsia prostática.
- Presencia de cáncer del tracto genitourinario inferior.
- Urolitiasis.
- Desórdenes del tracto gastrointestinal: fisura del ano, dolor pélvico crónico, fístula.
- Enfermedad neurológica con afectación vesical.

La selección de los individuos y seguimiento, según la práctica clínica habitual de la URHA-CHUS, consiste en:

A. La pareja acude a la URHA-CHUS por primera vez para completar el estudio de esterilidad.

B. El mismo día la pareja pasa a consulta con el doctorando. En la misma se les explica que además del análisis de semen (seminograma), para completar el estudio del varón tendrá que realizar la recogida de tres muestras de orina y una semen para estudio microbiológico.

C. Seguidamente se le explica cómo proceder a la recogida de las muestras, para lo cual se le lee y explican las instrucciones detalladas en el anexo 2, el cual posteriormente se le entrega para llevar para casa y disponer de la información por si requiriera repasarla el día que proceda a la recogida.

D. Una vez explicado lo anterior se le informa que los datos obtenidos de las pruebas microbiológicas realizadas como práctica asistencial habitual del estudio de esterilidad del varón, podrían ser utilizados para el presente estudio y que debe leer la hoja informativa

(anexo 3, versión en castellano o anexo 4, versión gallego) antes de decidir su aceptación o rechazo a participar.

F. En caso de aceptación ambos miembros de la pareja deben firmar el consentimiento informado anexo 3 en castellano, o anexo 4 en gallego.

G. Tras la firma del consentimiento, el varón tiene que cumplimentar el cuestionario NIH-CPSI versión en castellano descrito en el anexo 5.

H. Se le explica al varón que en caso de que alguna de las pruebas para detección de ITREM sea positiva y requiera tratamiento, será avisado vía telefónica por parte del doctorando para citar con la ginecóloga (siempre la misma) y pautar el tratamiento de elección según protocolo descrito en el apartado 3.1.1.7 a ambos miembros de la pareja.

I. Se le explica que durante los 1, 7 ó 14 días que dure el tratamiento, en caso de mantener relaciones, estas han de ser con protección (preservativo). Se realizará un control post-tratamiento (a ambos miembros de la pareja) a las 3-4 semanas de la finalización del mismo para constatar la eliminación del microorganismo.

En caso de que se confirme el fracaso terapéutico en alguno de los miembros de la pareja, se repetirá el tratamiento con un antibiótico alternativo y el control tras la finalización del mismo con los mismos criterios que en el apartado anterior.

El control post-tratamiento se realizará en muestras de orina (primeros 10 mL de la micción, O1). Se vuelve a recomendar el seguimiento de las normas de recogida de la orina (anexo 2 en el hombre) y en el caso de la recogida por parte de la mujer se recomienda lavado genital para evitar contaminación con la microbiota perineal.

J. Tras la finalización del tratamiento se repetirán las pruebas para confirmar la eliminación del microorganismo.

K. En caso de no haber sido efectivo el tratamiento, se les vuelve a citar vía telefónica para pautar tratamiento alternativo hasta conseguir negativización.



### 3.1.1.5 Aspectos ético-legales

El desarrollo del estudio se realizó respetando la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (AMM) de 1964 y ratificaciones de las asambleas siguientes (Tokio, Venecia, Hong Kong, Sudáfrica, Edimburgo, Washington, Tokio, Seúl, Fortaleza) sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, y la orden SCO/256/2007, de 5 de febrero por la que se establecen las directrices detalladas de buena práctica clínica y el convenio relativo a los derechos humanos y a la biomedicina, realizado en Oviedo el 4 de abril de 1997 y sucesivas actualizaciones.

El doctorando se comprometió a que todo dato clínico de los sujetos a estudio se separará de los datos de identificación personal de modo que se asegurara el anonimato del individuo; respetando la Ley de Protección de Datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre), el RD 1720/2007 de 21 de diciembre por el que se aprueba el reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, la Ley 41/2002 de 14 de noviembre (básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica), así como la Ley 3/2001, de 28 de mayo, (reguladora del consentimiento informado y de la historia clínica de los individuos), la Ley 3/2005, de 7 de marzo, de modificación de la Ley 3/2001 y el Decreto 29/2009 de 5 de febrero por el que se regula el acceso a la historia electrónica.

Los datos clínicos de los individuos se recogieron por el doctorando en el cuaderno de recogida de datos (CRD) específico del estudio (hoja Excel). El CRD se codificó, para proteger la identidad de los individuos. Sólo el doctorando y las autoridades sanitarias, tienen el deber de guardar confidencialidad, y tendrán acceso a todos los datos recogidos para el estudio. Solamente se podrá transmitir a terceros información que no pueda ser identificada.

Una vez terminado el estudio, los datos se anonimizaron para su utilización futura, pidiendo permiso expreso para ello en el consentimiento informado a los participantes (anexo 3 o 4).

Respecto al tratamiento de las muestras, se realizó acorde a la práctica clínica habitual, desechando las mismas una vez que se analizaron (anexo 3 y 4).

El estudio cumplió con:

- \* Los estándares asistenciales del SERGAS.
- \* Cumplimiento de las normas de buena práctica clínica.
- \* Aprobación por el comité de Ética e Investigación de Lugo y Santiago y por la Comisión de investigación del CHUS con código de registro 2015/493 con fecha 23/09/2015.
- \* Autorización por parte de la Dirección Asistencial del CHUS.
- \* El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

### 3.1.1.6 Protocolo de estudio propuesto (ver Esquema 3.1)

#### 3.1.1.6.1 Estudio semicualitativo de encuesta con respuesta fija.

Cuestionario NIH-CPSI versión en castellano (ya validado en estudios previos) relativo a posibles síntomas de prostatitis.

#### 3.1.1.6.2 Detección de los microorganismos habitualmente asociados a colonización/infección del ITREM.

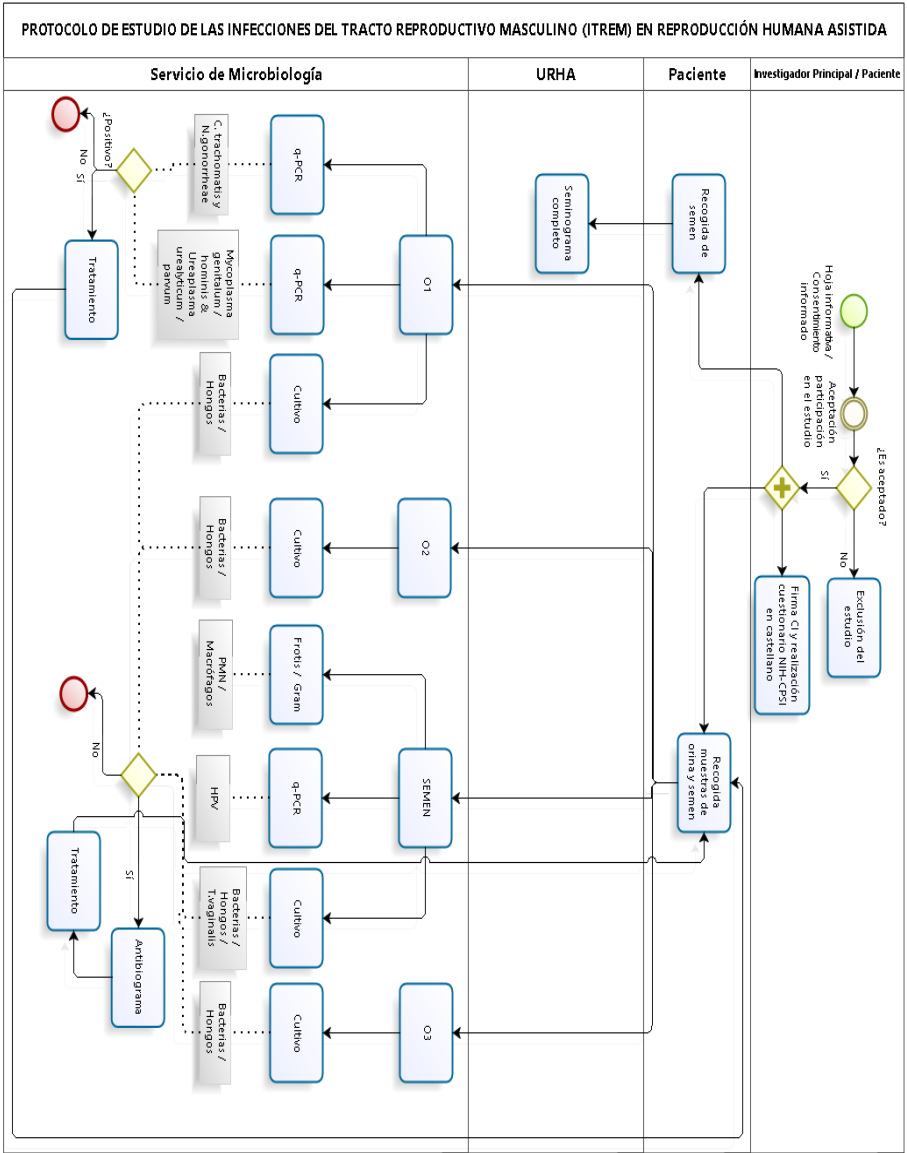
Las muestras a tomar para el protocolo propuesto en este estudio serán (ver **tabla 3.1** y anexo 2):

- \* O1: 10-15 ml del primer chorro de orina.
- \* O2: 10-15 ml del chorro medio de orina.
- \* SE: semen.
- \* O3: 10-15 ml del primer chorro de orina obtenida inmediatamente después del eyaculado.

**Tabla 3.1. Muestras y microorganismos analizados para el diagnóstico de ITREM.**

	<i>hominis yM. genitalium</i>	<i>U. urealyticum /parvum</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>T. vaginalis</i>	PMN / macrófagos	VPH	Bacterias relevantes	Hongos
O1	q-PCR	q-PCR	q-PCR	q-PCR				Cultivo cuantitativo	Cultivo cuantitativo
O2								Cultivo cuantitativo	Cultivo cuantitativo
SEMEN				Cultivo	Cultivo	Frotis / gram	q-PCR	Cultivo cuantitativo	Cultivo cuantitativo
O3								Cultivo cuantitativo	Cultivo cuantitativo

*Abreviaturas:* PMN, polimorfonucleares; O1, primer chorro de orina; O2, chorro medio de orina; SE, semen; O3, primer chorro de orina obtenida inmediatamente después del eyaculado; q-PCR, PCR cuantitativa o quantitative Polymerase Chain Reaction.



**Esquema 3.1. Protocolo de estudio de ITREM en RHA.**

Una vez incluido en el estudio, pruebas realizadas a las distintas muestras del protocolo de Meares y Stamey modificado (uso de semen en lugar de fluido prostático). *Abreviaturas:* ITREM, Infección del Tracto Reproductor Masculino; RHA, Reproducción Humana Asistida.

### 3.1.1.6.3 Seminograma

Para caracterizar la calidad del semen aplicando los criterios del manual de la WHO, 2010.

### 3.1.1.6.4 Condiciones preanalíticas para la recogida del semen y de la orina

La interpretación correcta de los resultados obtenidos en el protocolo de estudio propuesto, precisa de unas condiciones preanalíticas rigurosas que hagan que las muestras facilitadas estén libres de microbiota contaminante de la piel. Esto hará que la interpretación sólo sea dependiente de la concentración y del tipo de germen aislado, de la asociación o no de leucospermia, de la clínica, de las alteraciones espermáticas reflejadas en el seminograma, de la asociación eventual de una infección cervicovaginal de la pareja y de la TRHA a realizar.

Es por ello, que ha todos los individuos del estudio se les facilitó información verbal y escrita basada en el Anexo 2, acerca de cómo realizar la recogida de las muestras de orina y semen.

### 3.1.1.7 Tratamiento de las ITREM detectadas

Tras los primeros resultados post tratamiento de nuestros individuos y coincidiendo con la publicación de la Guía Europea 2016 para el manejo de las uretritis no gonocócicas (Horner y *col.*, 2016), la pauta de tratamiento seguida fue:

#### ***Chlamydia trachomatis:***

- Tratamiento de elección:
  - DOXICICLINA, 100 mg VO, dos veces al día durante 7 días ó
  - AZITROMICINA, 1 g por VO, como dosis única
- Tratamiento alternativo:
  - LEVOFLOXACINO 500 mg/día VO durante 7 días ó
  - AMOXICILINA, 500 mg por vo, 3 veces al día durante 7 días

#### ***Mycoplasma genitalium:***

- AZITROMICINA 500 mg vo una sola dosis + AZITROMICINA 250 mg vo una sola dosis durante 4 días ó

- MOXIFLOXACINO 400 mg vo una vez al día durante 7-14 días

***Mycoplasma hominis***

- DOXICICLINA, 100 mg VO, dos veces al día durante 7 días ó
- MOXIFLOXACINO 400 mg vo una vez al día durante 7-10 días

***Ureaplasma parvum ó Ureaplasma urealyticum***

- DOXICICLINA, 100 mg VO, dos veces al día durante 7 días ó
- AZITROMICINA, 1 g por VO, como dosis única ó
- LEVOFLOXACINO 500 mg/día VO durante 7 días
- CLINDAMICINA 300 mg/ 2 comprimidos/12 horas/7 días VO + probiótico vaginal

3.1.1.8 Variables y mediciones

*3.1.1.8.1 Datos demográficos y antecedentes personales de la Historia Clínica.*

\* Edad del hombre (<25, 25-34, 35-44, 45-54) y edad de la mujer: se obtiene por diferencia de la fecha de nacimiento y la de la inclusión en el estudio.

\* Raza del hombre.

\* Tipo de esterilidad: primaria, secundaria. Dato que se obtiene de ambos miembros de la pareja.

\* Duración de la esterilidad en meses. Dato que se obtiene de la mujer.

\* Diagnóstico de esterilidad. Dato que se obtiene de ambos miembros de la pareja.

\* Clasificación de la esterilidad femenina.

\* Clasificación de la esterilidad masculina.

\* Consumo de tabaco actual en el hombre: no, si (número de cigarrillo/día).

\* Consumo excesivo de alcohol en el hombre: no, si (> 28 unidades/semana) (Carne, 2012).

\* Historia previa de infección de transmisión sexual en el hombre y en la mujer.

Todas estas variables secundarias son variables de tipo descriptivo.

#### *3.1.1.8.2 Infección del tracto reproductivo masculino (ITREM).*

Se considera según las guías de la OMS, a aquellos individuos con alteración de los parámetros seminales y que adicionalmente cumplen criterios clínicos, y con positividad de los cultivos de orina posteyaculado y/o semen (Rowe, 2000). Puede haber resultados microbiológicos positivos en ausencia de datos clínicos en el caso de infección asintomática o de colonización por microorganismos comensales.

Esta es la variable principal, dicotómica (definición de caso: infección sí o no) y se obtiene del resultado de los cultivos y las técnicas de biología molecular.

- \* ITREM: no, sí. Positividad en alguna de las pruebas realizadas en el protocolo de ITREM.

- \* Bacteriospermia: presencia o no de bacterias en los distintos cultivos realizados a las 4 muestras (O1, O2, semen y O3), o de positividad en las técnicas de biología molecular realizadas a O1.

- \* Hongos: presencia o no de hongos en los distintos cultivos realizados a las 4 muestras (O1, O2, semen y O3).

- \* Virus: detección VPH en semen

#### *3.1.1.8.3 Bacteriospermia.*

- \* % de cada bacteria con respecto al total de aislamientos.

- \* Presencia o no de leucospermia: > 1 millón/mL PMN en el eyaculado fresco.

- \* Tratamiento y efectividad del mismo.

La relación entre bacteriospermia y leucospermia y las distintas especies bacterianas aisladas se evaluarán mediante la prueba de chi cuadrado, con p valor <0.05 como significativo.

#### *3.1.1.8.4 Hongos.*

- \* % de cada hongo con respecto al total de aislamientos.

- \* Presencia o no de leucospermia: > 1 millón/mL PMN en el eyaculado fresco.

- \* Tratamiento y efectividad del mismo.

#### *3.1.1.8.5 Seminograma.*

- \* Volumen del eyaculado en ml.

- \* pH seminal.

- \* Viscosidad: normal, ligeramente aumentada, aumentada, muy aumentada, reducida.

- \* Agregaciones: no agregados, 5, 10, 15, 20, 25, 30% de agregados.

- \* Aglutinaciones de los espermatozoides: ausencia, pocas, moderadas, abundantes.

- \* PMN: n° de polimorfonucleares en millones/mL de eyaculado.

- \* MARTEST (detección de anticuerpos unidos a espermatozoides): negativo, positivo, no valorable.

- \* n° de espermatozoides en millones/mL de eyaculado.

- \* % de espermatozoides con movilidad progresiva.

- \* % de espermatozoides con movilidad no progresiva.

- \* % de espermatozoides inmóviles.

- \* % de espermatozoides con morfología normal.

- \* % de espermatozoides con morfología anormal: de cabeza, pieza intermedia o cola.

- \* Prueba de vitalidad (prueba de eosina-nigrosina): % de espermatozoides vivos.

- \* REM (recuperación de espermatozoides móviles): n° total de espermatozoides progresivos recuperados en millones totales.

- \* Diagnóstico del seminograma: normozoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia, oligoastenozoospermia, oligoteratozoospermia, oligoastenoteratozoospermia, astenoteratozoospermia.

Todas ellas se expresan como valores medios con su desviación estándar correspondiente.

Se utilizan pruebas paramétricas y en caso de necesidad las variables fueron transformadas logarítmicamente ( $\log_{10}$ ) para normalizar su distribución.

*3.1.1.8.6 Cuestionario NIH-CPSI (puntuación, ver anexo 5):*

El cuestionario explora los tres grandes dominios de la prostatitis: el dolor (puntuación 0-21), las alteraciones miccionales (puntuación 0-10) y el impacto sobre la calidad de vida (puntuación 0-12), siendo la puntuación total del NIH-CPSI de 0-43 puntos.

Se calculan y se informan tres puntuaciones por separado que reflejan los tres dominios mencionados de la prostatitis:

Puntuación a. Dolor (0-21 puntos):

- \* Localización del dolor: preguntas 1a, 1b, 1c, 1d, 2a y 2b (0-6 puntos).
- \* Frecuencia del dolor: pregunta 3 (0-5 puntos).
- \* Severidad del dolor: pregunta 3 (0-10 puntos).

Puntuación b. Síntomas urinarios:

- \* De tipo obstructivo: preguntas 5 (5 puntos).
- \* De tipo irritativo: preguntas 6 (5 puntos).

Puntuación c. Efecto sobre la calidad de vida: (0-12 puntos):

- \* Efecto de los síntomas: preguntas 7 y 8 (0-6 puntos).
- \* Calidad de vida: pregunta 9 (0-6 puntos).

En cuanto a la interpretación de los resultados, cuanto más alta sea la puntuación mayor será la severidad del problema. Se calcula:

1. Las tres puntuaciones por separado: puntuación a, puntuación b, y puntuación c.

La puntuación del dolor (puntuación a) se gradúa en:

- \* Leve (0 a 7 puntos).
- \* Moderado (8 a 13 puntos).
- \* Severo (14 a 21 puntos).



2. Se calcula y se informa en conjunto la suma de la puntuación dolor (puntuación a) y puntuación síntomas urinarios (puntuación b), denominados en conjunto puntuación de escala de síntomas (*symptom scale score*). En este caso se gradúa en:

- \* Leve: 0-9 puntos.
- \* Moderado: 10-18 puntos.
- \* Severo: 19-31 puntos.

3. Se calcula y se informa la puntuación total (0-43 puntos).

Se describe el número de hombres catalogados por el cuestionario como poco probable (0-3 puntos), probable (4-7 puntos) o muy probable (8-43 puntos) que tuvieran prostatitis (una de las posibilidades de ITREM).

#### 3.1.1.9 Análisis estadístico

Los datos demográficos y de antecedentes personales, los resultados de las pruebas microbiológicas, y del seminograma se obtuvieron a través de consulta de la historia clínica informatizada (sistema IANUS). Los datos de puntuación del Cuestionario NIH-CPSI se obtienen directamente del cuestionario en papel.

Se creó una base de datos Excel específicamente diseñada para la codificación de los datos donde se pudo cruzar el código numérico identificativo creciente de cada paciente con el número de historia clínica del SERGAS. Una vez finalizada la recogida de datos esta base se destruyó y se conservó únicamente el código identificativo de paciente para la explotación estadística.

Se creó otra base de datos en Excel donde se recogió de cada código numérico identificativo de paciente todas las variables y las respuestas del cuestionario NIH-CPSI versión castellano para su posterior explotación estadística con el software SPSS.

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de las variables recogidas a estudio para determinar las características de la muestra. Los resultados de las variables continuas se representan como media y desviación típica o bien, si utilizamos la mediana como mediana y rango intercuartílico (percentil25-percentil75), en función del ajuste a

la normalidad de los parámetros estudiados. Las variables categóricas se representan como número y el porcentaje (n (%)). El ajuste a la normalidad se calculó con la Prueba de Kolmogorov-Smirnov en los casos de más de 50 unidades de análisis o la de Shapiro-Wilk en los de menos de 50. Para la caracterización de la forma y distribución de los datos se aplicaron los coeficientes de asimetría y curtosis.

Mediante análisis de asociación se estudiaron las siguientes covariables: edad (continua), consumo de tabaco hombre (sí/no), y consumo de alcohol (sí/no). Para estudiar el efecto del tabaco sobre los parámetros del seminograma se calculó la odds ratio (OR, IC95%). Al ser la variable principal de naturaleza dicotómica (itrem), las covariables categóricas se contrastaron mediante la prueba de la Chi cuadrado (grados de libertad) si el valor de la frecuencia esperada era superior a 5 en más del 75% de las asociaciones, si no era así se utilizó la prueba exacta de Fisher. Las variables de naturaleza continua y paramétrica se contrastaron con la t de student (normalizada) y las continuas no paramétricas fueron transformados exponencialmente (lnINM: % de espermatozoides inmóviles) para normalizar su distribución o contrastadas mediante la prueba de la U de Mann Whitney, y también si la muestra es muy pequeña ( $n < 30$ ). Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utilizó la prueba de Levene.

Se aplicó el contraste de hipótesis ANOVA para determinar si existían diferencias en la media de las variables cuantitativas frente a los grupos definidos por la variable de exposición cualitativa con 2 categorías.

Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos que alcanzan un p-valor (grados de libertad)  $< 0,05$ .

Los análisis preliminares de regresión univariante se realizaron con el fin de seleccionar las covariables, que afectan a los parámetros del semen. Igualmente se utilizaron para valorar si son diferentes entre los pacientes con positividad para ITREM y aquellos para los que todos sus análisis fueron negativos. Una vez seleccionadas, se incluyeron en los modelos definitivos de regresión lineal múltiple.

Para comprobar qué variables se asociaron de forma independiente (edad, tabaco, ITREM) con el % de PR y de INM se

realizó un análisis de regresión múltiple. Se comprobaron las asunciones de linealidad, independencia de los residuos, homocedasticidad y normalidad de los residuos. Las variables seleccionadas fueron aquellas que salieron estadísticamente significativas en el análisis univariante realizado previamente. El método que se utilizó fue el de introducir las variables consecutivamente. En el caso de % de INM se tuvo que normalizar previamente la variable mediante transformación exponencial.

Para determinar el punto de corte con mejor poder discriminatorio del cuestionario NIH-CPSI para ITREM se ha utilizado un análisis mediante curvas ROC.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS v22.0 (IBM Corp. Armonk, NY: IBM Corp); el software R-Commander paquete Gamless.

#### 3.1.1.10 Recursos disponibles

El estudio se llevó a cabo en el CHUS:

- \* La firma del consentimiento informado para la toma de datos y muestras, y la realización del cuestionario NIH-CPSI versión en castellano, se realizó en consulta.

- \* La recogida de las muestras de orina y semen para el estudio microbiológico se realizó en el domicilio del paciente quien se comprometió a su entrega en el laboratorio en menos de 3 horas.

- \* La recogida de la muestra de semen para el seminograma se realizó en un baño habilitado exclusivamente para ello en la URHA-CHUS.

- \* El estudio de los parámetros del semen se realizó en el laboratorio de Andrología de la URHA-CHUS.

- \* El estudio microbiológico fue realizado por el Servicio de Microbiología del CHUS.

#### 3.1.1.11 Financiación

Todos los datos recogidos así como las pruebas realizadas a las distintas muestras facilitadas por los individuos, se incluyen en el protocolo habitual de estudio/tratamiento de las parejas que acuden a

la URHA-CHUS. Por ello, no se precisó de financiación externa para el desarrollo del estudio.

#### 3.1.1.12 Tareas desarrolladas por el doctorando

- \* Dirección del trabajo.
- \* Definición de las variables a estudio.
- \* Lectura y entrega de la hoja de información y del consentimiento informado.
- \* Coordinación de la toma de datos y cumplimentación del cuestionario NIH-CPSI en castellano.
- \* Explicación oral y escrita, y vigilancia del cumplimiento de las condiciones preanalíticas para la recogida estéril de las muestras de orina y semen.
- \* Recogida de los datos en hoja Excel.
- \* Seguimiento de los resultados microbiológicos y contacto con los individuos para instauración de tratamiento en los casos positivos.
- \* Seguimiento hasta la negativización de las pruebas microbiológicas.
- \* Realización de los análisis de semen.
- \* Creación de la base datos en SPSS de las variables a estudio.
- \* Depuración de los datos.
- \* Explotación estadística de los datos.
- \* Interpretación de los resultados obtenidos.
- \* Escritura y presentación de resultados.
- \* Difusión científica de los resultados e información de los resultados a los participantes que lo demanden.

#### 3.1.1.13 Tareas desarrolladas por el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago

- \* Estudio microbiológico de prostatitis mediante cultivo de O1, O2, semen y O3.
- \* Realización de las técnicas moleculares para la detección de microorganismos en O1 y semen.

### 3.1.2 Seminograma completo

Se tomaron los datos del primer análisis que se realizó como parte del estudio de esterilidad.

#### 3.1.2.1 Recolección de la muestra

Cada paciente obtuvo la muestra de semen por masturbación recomendándose un período de abstinencia de 72-96 horas. En caso de recogerse en el domicilio se recibió en el laboratorio en menos de una hora protegida del frío. De no cumplirse estas condiciones, los resultados pueden no ser representativos ni fiables. Ver anexo 6.

#### 3.1.2.2 Instrucciones a los individuos

Antes de la recogida de la muestra de semen, el paciente recibe información verbal y escrita acerca del propósito del estudio y otros hechos importantes, con el fin de evitar problemas con las condiciones preanalíticas siendo advertido de la importancia del tiempo de abstinencia sexual y de recoger el eyaculado completo. Si la muestra no puede ser obtenida en el laboratorio, ha de ser transportada protegida del frío (a temperatura ambiente cerca del cuerpo, para evitar choque por frío a + 20°C) y entregada al laboratorio preferiblemente en 30 minutos, pero como mucho 1 hora después de la eyaculación. Si pasan más de 60 minutos, los resultados pueden no ser representativos ni fiables. Ver anexo 6.

#### 3.1.2.3 Equipo y materiales

El equipo y materiales que se listan aquí son para la recogida del semen y el examen de la preparación en fresco en general.

- Recipiente para recogida de muestras (Sarstedt 100 mL; #75.563; tapa #76.564).
- Preservativo especial para recolección de semen (Milex products Inc. Chicago, Illinois 60631, EEUU; Male Factor Pack®, Hygiene®, Fertipro NY, Bélgica; Durex Avanti).
- Guantes de látex para laboratorio.
- Tetina goma p/pipeta, caucho 2 ml St Gobain Performance Plastics 10101110 TF 7740K Fisher Scientific - Afora

- Pasteur pipets 9" (22.9 cm) long without cotton plugged PP-9-90 Origio ORIGIO MEDICULT ESPAÑA S.L.
- Gradilla 50 tubos 16 mm.. INOX. 210\*110\*60 1134A210 Comercial Hospitalaria Grupo 3.
- Tubos Falcon 15 ml 17 x 120 mm 352095 estériles Fisher Fisher Scientific – Afora.
- Tubos de 5 ml 12x75 mm 352003 estériles unitarios Fisher Fisher Scientific – Afora.
- Pipetas estériles 5 ml BD 357543 Comercial Hospitalaria Grupo 3.
- Pipetas estériles 10 ml BD 357551 Comercial Hospitalaria Grupo 3.
- Pipetas estériles 1 ml BD 357521 Comercial Hospitalaria Grupo 3.
- Pipetas estériles 2 ml BD 357507 Comercial Hospitalaria Grupo 3.
- *Pipetas* para la realización del análisis del semen:
  - PIPETA Eppendorf Research plus 0,1-2,5 µL.
  - PIPETA Eppendorf Research plus 0,5-10 µL.
- Puntas de pipeta: plástico, para pipetas de desplazamiento de aire:
  - Punta de pipeta 0,1-20 µL biopur Eppendorf 0030 075.005 TF E95780 Fisher Scientific – Afora.
  - Punta de pipeta 2-200 µL biopur Eppendorf 0030 075.021 TF E95781 Fisher Scientific – Afora.
  - Punta de pipeta 50-1000 µL biopur Eppendorf 0030 075.064 E95789 Fisher Scientific – Afora.
- Portaobjetos de microscopio (tamaño estándar); cubreobjetos (22X22 mm; grosor #1½).
- Cámara de recuento Counting chamber Makler Sefi Medical Instruments 0,01 sq. mm; con cubreobjetos reticulado de 10 µm de profundidad, MICROPTIC S.L.
- Cámara LEJA de 10 micras de profundidad. 4 posiciones por cámara. 03062 MICROPTIC S.L.
- Papel indicador pH 6,4-8 MERCK 109.557.003 COSTOYA S.L.

- Calculadora.
- Microscopio de contraste de fases (objetivo de 20x o 40x) con pletina termostatzada a 37°C y tubo triocular (oculares y tubo para cámara): Leica DM2500.
- Sistema CASA: ANALIZADOR DIGITAL MUESTRAS DE SEMEN SCA® (Sperm Class Analyzer) FULL HUMAN de Microptic con cámara digital en color basler scout sca780-54fc, y Ordenador personal (HP Compaq 8000 Elite, Intel Core2 Quad Q9500, 2,83 GHz, 4,00 GB RAM, 32 bits, Windows 7 Professional, Service Pack 1) con Monitor de 19 pulgadas color (HP Compaq LA1951g).
- Centrífuga DIGICEN 21R ORTO ALRESA (1000-3000 rpm). N.B. La fuerza centrífuga relativa (FCR; g) se calcula a partir de la fórmula  $g = 1118 * 10^{-8} * R * N^2$ , donde R = distancia en centímetros desde el centro del rotor al punto en el que se requiere la FCR (p.ej. el fondo del tubo) y N = revoluciones por minuto.
- Incubador de CO<sub>2</sub> DE 50 L CB-53 BINDER.
- Estfa de cultivos BF-115 BINDER (32°C) con rotor oscilante en su interior.
- MARSCREEN® BS-MAR-G MarScreen IgG determinations BioScreen BIO CARE EUROPE ESPAÑA S.L.
- Medio de manipulación para fines múltiples completo MHM c/ gentamicina Irvine 90166 BIO CARE EUROPE ESPAÑA S.L.
- Medio de separación de esperma Isolate 50% Irvine 99264 BIO CARE EUROPE ESPAÑA S.L.
- Medio de separación de esperma Isolate 90% Irvine 99264 BIO CARE EUROPE ESPAÑA S.L.
- Eosina-Nigrosina 996518, 2 x 10 mL Química Clínica Aplicada S.A. Francisco Soria Melgizo SA.
- Aceite de inmersión D. 1,48, Merck 1,04699,0100, 100 mL Francisco Soria Melgizo SA.
- Frascos teñidores de 125 mL E 22188 Fisher Scientific.
- Panóptico rápido N° 1 991681 500 mL, Química Clínica Aplicada S.A., Francisco Soria Melgizo SA.

- Panóptico rápido Nº 2 994239 500 mL, Química Clínica Aplicada S.A., Francisco Soria Melgizo SA.
- Panóptico rápido Nº 3 992426 500 mL, Química Clínica Aplicada S.A., Francisco Soria Melgizo SA.
- Agua destilada: agua para irrigación Labesfal, Laboratorios Almiro, S.A., Santiago de Besteiros, Portugal.

#### 3.1.2.4 Secuencia en la realización del seminograma

*En los primeros 5 minutos:*

- Registrar la muestra, etiquetar el recipiente y los documentos del laboratorio (con por lo menos 2 identificadores únicos).
- Colocar el frasco de recogida en estufa (32 °C) para favorecer su licuefacción.

*Entre los 30 y 60 minutos (si no se licuó a los 30 minutos, se esperó hasta los 60 minutos para iniciar el análisis):*

- Evaluar la licuefacción, olor y la apariencia visual.
- Medir el volumen de semen.
- Medir el pH.
- Evaluar la apariencia microscópica (agregación/aglutinación, otras células y detritus), la motilidad y la concentración espermática con el módulo SCA<sup>®</sup> correspondiente.
- Si el porcentaje de espermatozoides móviles es < 40%, preparar las extensiones para evaluar la vitalidad mediante la tinción de eosina-nigrosina.
- Preparar las extensiones para evaluar la morfología de los espermatozoides.
- Realizar el MAR test.
- Si están presentes células redondas inflamatorias en cantidad mayor a  $1 \times 10^6/\text{mL}$ , evaluar la positividad de las células a la peroxidasa para determinar la concentración de PMN. Esta última se estima, en porcentaje, comparando el número de células redondas de la preparación teñida con el de la preparación en fresco.



*Dentro de los 60 y 120 minutos:*

- Fijar, teñir y evaluar las preparaciones para la morfología espermática.
- Realizar el estudio funcional (recuperación de espermatozoides móviles, REM) mediante la técnica de gradientes de densidad (GD).

### 3.1.2.5 Examen macroscópico inicial

La muestra se homogeniza en un agitador orbital a 32° C durante 25-30 minutos antes de su estudio.

#### 3.1.2.5.1 Licuefacción

La licuefacción se consigue en un tiempo de unos 15 minutos a temperatura ambiente, aunque raramente tarda 60 minutos o más. Si no se licúa antes de los 60 minutos se registra. Comprobar si la licuefacción es completa o si hay restos de gránulos de gelatina (cuerpos gelatinosos), partículas de gel o filamentos mucosos. En tal caso, colocar el espécimen de nuevo en la estufa durante algunos minutos más (el examen se empieza en cualquier caso en el intervalo de 60 minutos después de la eyaculación). Las desviaciones de los hallazgos normales se anotan. La licuefacción defectuosa NO se solventa NUNCA con el paso de la muestra por una aguja sino licuando el semen enzimáticamente usando un frasco de semen impregnado con quimiotripsina (Tucker y col., 1990).

#### 3.1.2.5.2. Viscosidad

Tras la licuefacción, evaluar la viscosidad de la muestra aspirando lentamente el eyaculado en el interior de una pipeta Pasteur de vidrio desechable (aproximadamente 15 mm de diámetro) permitiendo que el semen caiga gota a gota por gravedad y observando la longitud de cualquier hilo que se forme. Si la viscosidad es anormal se anota "viscosidad aumentada" en la hoja de trabajo. El método utilizado para reducir la viscosidad es el mismo que el utilizado para muestras con licuefacción retardada (quimiotripsina).

### *3.1.2.5.3. Volumen*

Realizar la medida del volumen por decantación en un tubo Falcon cónico de 15 mL graduado leyendo directamente de las graduaciones del tubo (0,1 mL de exactitud).

### *3.1.2.5.4 pH*

El pH se midió después de la licuefacción tras 30 minutos, pero antes de 60 minutos tras la eyaculación para evitar el efecto de la pérdida de CO<sub>2</sub>. Para ello se utilizaron tiras de pH en el rango de 6,0 a 8,4. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Mezclar bien la muestra.
- Colocar una gota de semen sobre la tira.
- Esperar a que el color de la zona impregnada sea uniforme (<30 segundos).
- Comparar el color obtenido en el reverso de la misma con la escala de colores.

### *3.1.2.6. Examen microscópico inicial*

Se utilizó un microscopio de contraste de fases para todos los exámenes de preparaciones de muestras en fresco. Se carga la muestra de semen en la cámara de Makler (4 µL) y se efectúa el examen microscópico inicial a 200 x en el que puede observarse:

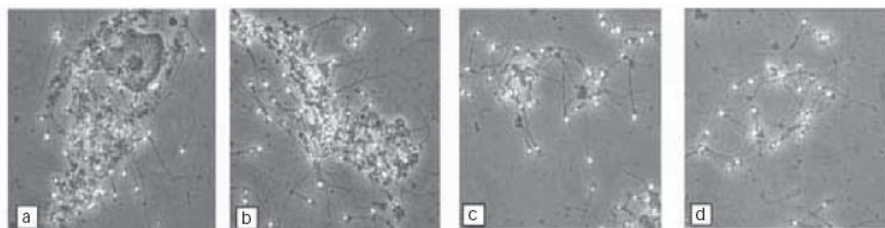
- Formación de hilos de moco.
- Agregación o aglutinación espermática.
- Presencia de otras células distintas a los espermatozoides, como células epiteliales, “células redondas” (leucocitos o células germinales inmaduras) y cabezas o colas espermáticas aisladas.
- Estimación del número de espermatozoides para valorar la necesidad de dilución de la muestra previo al conteo y movilidad espermática en cámara Leja con sistema CASA.

### *Procedimiento de ensayo:*

Se retira una alícuota de 4  $\mu$ L de semen del tubo de fondo cónico previa homogenización suavemente (para evitar la formación de burbujas) mediante aspiración/vaciado con pipeta Pasteur estéril unas 10 veces. A continuación, se cargan los 4  $\mu$ L en la cámara de Makler atemperada a 37°C. El número de espermatozoides se expresa en millones/mL.

### 3.1.2.6.1 Agregación y aglutinación espermática

La adherencia de los espermatozoides inmóviles entre sí, ó de espermatozoides móviles a hilos de moco, células no espermáticas o detritus, se considera como una *agregación* no específica (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Espermatozoides agregados unidos a células epiteliales (a), detritus (b) o espermatozoides (c, d).**




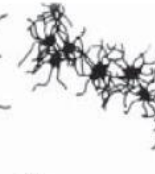
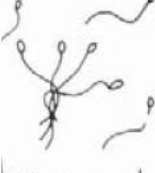











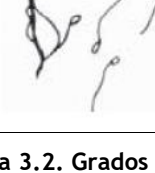



Distintas formas de agregarse los espermatozoides en el semen WHO, 2010. Con permiso de World Health Organization Press, ID: 282070

La agregación o aglutinación espermática se determina en 10 campos escogidos al azar, lejos de los bordes de la cámara de Makler. Se realiza una estimación del porcentaje promedio (estimado al 5% más próximo) de espermatozoides atrapados en grupos.

Registrar el grado de aglutinación presente (grado 1-4) así como el tipo (grado A-E) (ver Figura 3.2).

### 3.1.2.6.2 Otras células distintas a los espermatozoides

También inmediatamente después de la licuefacción se realizó un examen en fresco a 200 aumentos en contraste de fases con objeto de observar la movilidad de los espermatozoides, así como de identificar la presencia de células redondas, bacterias, levaduras o parásitos (*Trichomonas vaginalis*). Los PMN se cuentan y se promedian para determinar el número medio de PMN en semen por campo (Muller y col., 2001). Para su cuantificación se cargaron 4  $\mu$ L en cámara Makler.

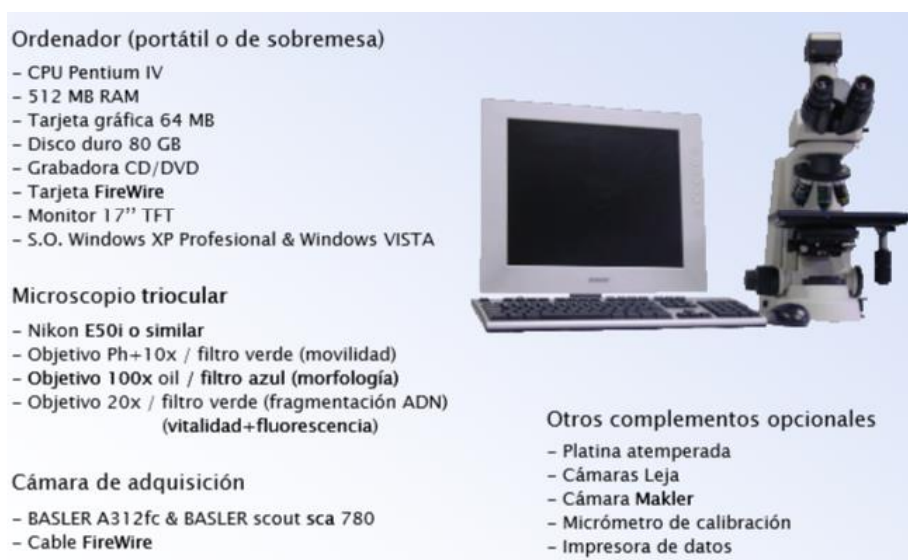
Partes involucradas	Grado de aglutinación			
	1. Aislados (< 10 espermatozoides / aglutinado, muchos espermatozoides libres)	2. Moderados (10-50 espermatozoides/aglutinado, espermatozoides libres)	3. Intenso (aglutinados de > 50 espermatozoides, algún espermatozoide todavía libre)	4. Muy intenso (todos los espermatozoides aglutinados, y aglutinados interconectados)
A. Cabeza-cabeza				
B. Cola-cola (las cabezas están libres y se mueven libres del aglutinado)				
C. Punta de la cola-punta de la cola				
D. Mezcla (cabeza-cabeza y cola-cola)				
E. Enredo (cabezas y colas enredadas. Las cabezas no están claramente aglutinadas dado que están en aglutinados cola-cola)				

**Figura 3.2. Grados y tipos de aglutinación espermática.**  
Tipos de aglutinación de los espermatozoides en el semen. *Modificado de WHO, 2010. WHO, 2010. Con permiso de World Health Organization Press, ID: 282070*

### 3.1.2.6.3 Evaluación de la movilidad espermática

Se empieza inmediatamente para evitar la caída de la temperatura o la deshidratación de la preparación.

Se utiliza un método automatizado para valorar la movilidad basado en el sistema CASA (*Computer-Aided Sperm Analyzer*) que permite valorar los parámetros de movilidad, concentración y morfología de forma objetiva. Ver figura 3.3.



**Figura 3.3. Equipo estándar SCA® de Microptic.**

Componentes del equipo utilizado para la medición de la concentración, movilidad y morfología de los espermatozoides en el semen. *Permitido por SCA®, Microptic®*

#### Protocolo seguido:

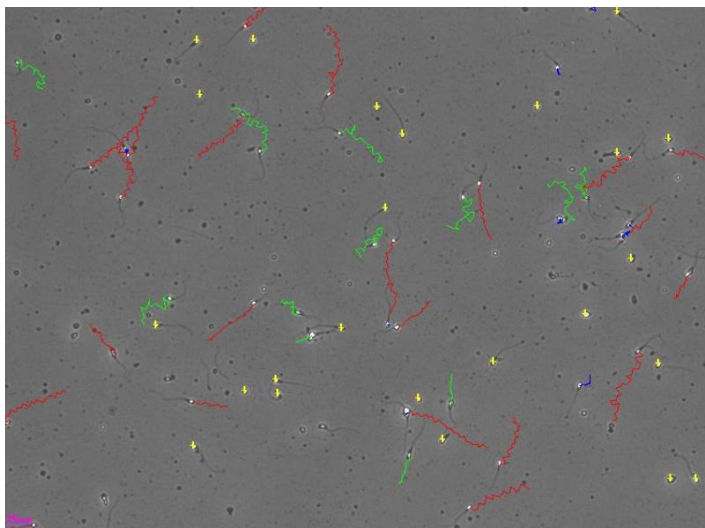
- Se mezcla bien la muestra de semen.
- Se retira una alícuota de semen (2  $\mu$ L) inmediatamente tras mezclar, en una cámara Leja desechable de 10  $\mu$ m de profundidad precalentada a 37°C.
- Se examina la cámara Leja con la óptica de contraste de fases positivo y filtro verde a 100x de magnificación total (objetivo 10x y ocular 10x). Ver tabla 3.2.

- Se capturan aproximadamente 200 espermatozoides con el módulo SCA<sup>®</sup> Movilidad y concentración de Microptic para evaluar el porcentaje de las distintas categorías.

#### 3.1.2.6.3.1. Categorías de la movilidad espermática

Se utiliza un sistema simple para graduar la movilidad espermática que distingue espermatozoides con movilidad progresiva y no progresiva de aquellos que son inmóviles.

En la figura 3.4 se puede observar como separa el sistema SCA<sup>®</sup> los espermatozoides según su movilidad.



**Figura 3.4. Ejemplo de captura mediante el software SCA<sup>®</sup> para la valoración de los distintos tipos de movilidad espermática.**

Descripción de las trayectorias de los espermatozoides para la clasificación del tipo de movilidad: color rojo, espermatozoides progresivos (PR, tipo a); color verde, espermatozoides progresivos (PR, tipo b); color azul, espermatozoides no progresivos (NPR); color amarillo, espermatozoides inmóviles (INM). *Permitido por SCA<sup>®</sup>, Microptic<sup>®</sup>*

Deben valorarse sólo los espermatozoides intactos (aquellos que tienen cabeza y cola). Se calcula el porcentaje de cada uno de los grupos (PR, NPR e INM).

### 3.1.2.6.4 Evaluación de la concentración espermática

La determinación del número de espermatozoides comprende los siguientes pasos:

- Tras examinar en cámara Makler, se determina si es necesario la dilución para el conteo en cámara Leja con el sistema SCA<sup>®</sup> (para un análisis correcto la concentración debe ser inferior a 100 millones de espermatozoides/mL). Esta preparación es la misma que la utilizada para evaluar la movilidad (ver sección 3.2.1.6.3.).
- Se mezcla el semen y se prepara la dilución en caso necesario con medio de lavado de espermatozoides.
- Se carga la cámara Leja con 2  $\mu$ L de semen o de la dilución.
- Se valora la muestra mediante el sistema SCA<sup>®</sup> con el módulo SCA<sup>®</sup> Movilidad y concentración de Microptic con la óptica de contraste de fases positivo y filtro verde a 100x de magnificación total (objetivo 10x y ocular 10x). Ver tabla 3.2.
- Se cuentan por lo menos 200 espermatozoides.
- Se calcula la concentración de espermatozoides por mL.
- El número total de espermatozoides en el eyaculado completo se obtiene multiplicando la concentración espermática por el volumen seminal.

**Tabla 3.2. Requisitos para la valoración microscópica del seminograma.**

SCA	MOVILIDAD Y CONCENTRACIÓN	MORFOLOGÍA	VITALIDAD	MAR TEST
<b>OBJETIVO</b>	10X (contraste de fases)	100x (aceite de inmersión)	20 ó 40x	20 ó 40x
<b>MÉTODO DE OBSERVACIÓN</b>	Contraste de fases +	Campo claro	Contraste de fases +	Contraste de fases +
<b>FILTRO</b>	Filtro verde	Filtro azul	Filtro azul	Filtro azul
<b>Porta / KIT / TINCIÓN</b>	Movilidad: Leja Concentración: Leja	Diff-Quik	Eosina-Nigrosina en fresco	MarScreen IgG

*Abreviaturas:* SCA, sistema CASA de la empresa Microptic o *Sperm Class Analyzer*; MAR, prueba de la reacción de antiglobulina mixta o *Mixed Antiglobulin Reaction Test*.



#### *3.1.2.6.4.1 Azoospermia u oligozoospermia severa*

Cuando no se observan espermatozoides en la preparación en fresco, se centrifuga la muestra para determinar si no se encuentran espermatozoides en toda la muestra. Para ello:

- Se mezcla bien la muestra de semen.
- Se centrifuga la muestra total de semen a 3000g durante 15 minutos.
- Se decanta la mayoría del sobrenadante y se resuspende el pellet en el sobrenadante remanente, aproximadamente 50  $\mu$ L del plasma seminal.
- Se dispensa una alícuota de 10  $\mu$ L del pellet resuspendido en un portaobjetos y se observa bajo un cubreobjetos de 22 x 22 mm. y examina la preparación a 200x en contraste de fases.
- Se revisa sistemáticamente el cubreobjetos campo por campo. Se empieza en una esquina y revisa a lo largo del eje x hacia el lado opuesto y en zig-zag. Así se logran examinar unos 484 campos.
- La presencia de espermatozoides en alguno de los replicados indica criptoospermia.
- La ausencia de espermatozoides sugiere azoospermia.

#### *3.1.2.6.5. Evaluación de la morfología espermática*

El módulo SCA<sup>®</sup> Morfología de Microptic permite el análisis automático de la morfometría y la clasificación morfológica de muestras teñidas y observadas en microscopía de campo claro.

La evaluación de la morfología espermática comprende los siguientes pasos:

- Preparación de la extensión de semen por duplicado sobre un portaobjetos tras depositar 4  $\mu$ L en los mismos. Extender la gota con el borde de otro portaobjetos por deslizamiento. Las extensiones han de ser uniformes y finas para permitir una buena tinción y un examen fácil.
- Se dejan secar las extensiones al aire, se fijan inmediatamente y se tiñen para posteriormente realizar la evaluación de la morfología espermática.



- Se tiñen las extensiones con los colorantes Panóptico 1, 2 y 3 (tinción rápida de Diff-Quik) que consiste en:
  - a. Reactivo fijador: tinte triarilmetano disuelto en metanol.
  - b. Solución de tinción 1: xanteno eosinofílico.
  - c. Solución de tinción 2: tiazina basofílica.

Se sumergen las preparaciones en el fijador con triarilmetano durante 15 segundos. Se escurre el exceso de solución fijadora colocando las preparaciones verticalmente sobre papel absorbente.

Se sumergen secuencialmente las preparaciones en:

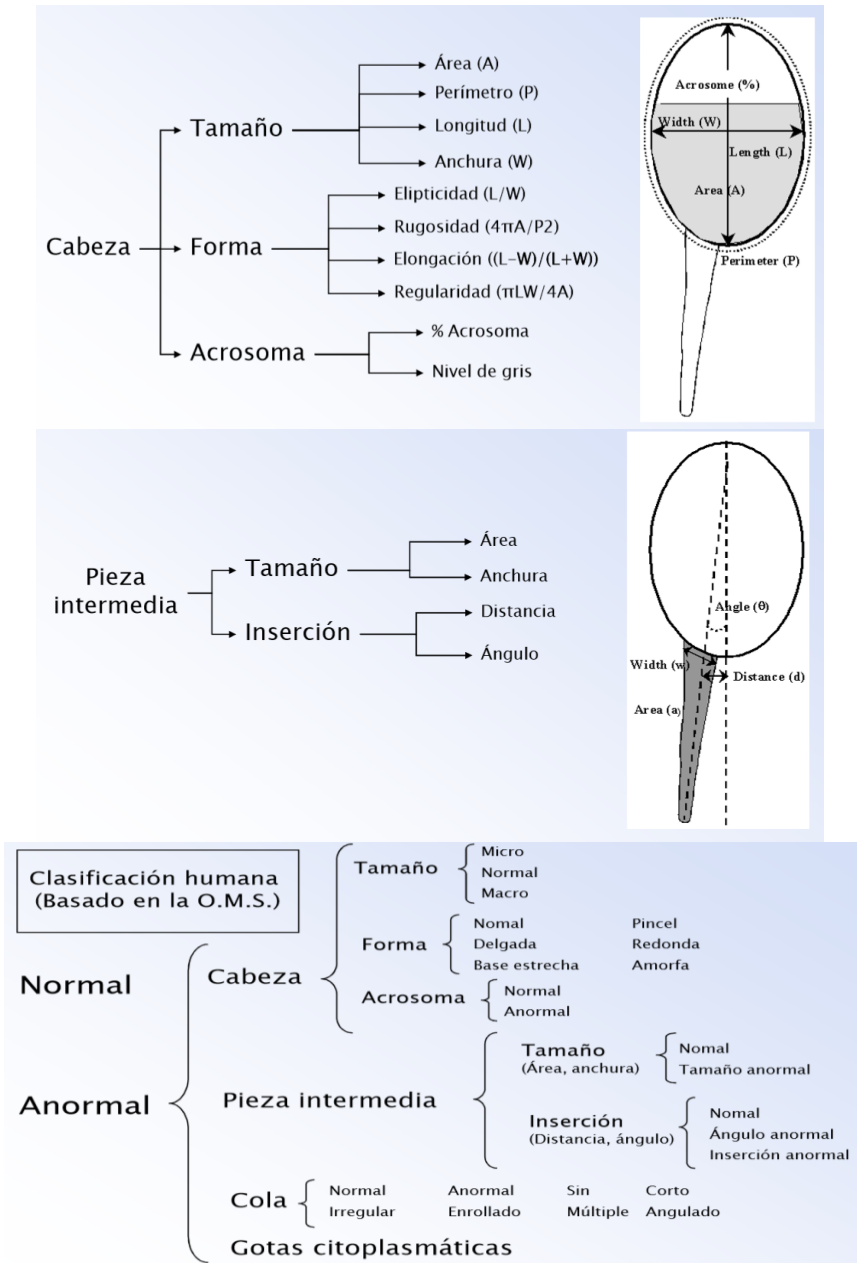
- a. Solución de tinción rápida 1: 10 segundos.
- b. Solución de tinción rápida 2: 5 segundos.
- c. Agua destilada: 5 a 10 veces para retirar el exceso de colorante.

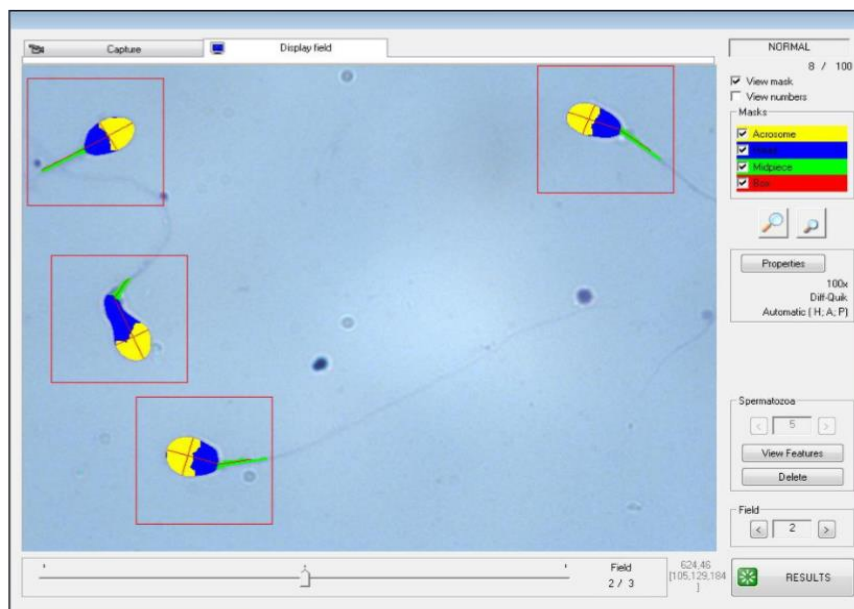
Se escurre el exceso de solución en cada paso colocando las preparaciones verticalmente sobre papel absorbente.

- Se realiza el examen de las extensiones con óptica de campo claro a 1000x. Ver tabla 3.2.
- Se clasifican aproximadamente 100 espermatozoides en cada extensión para el cálculo del % de formas normales y anormales.
- Se comparan los valores de los replicados para ver si se aceptan; si es así, se procede con los cálculos; sino, se reevalúan las extensiones.

Con los colorantes y la óptica de campo claro, la cabeza se tiñe de azul pálido en la región acrosomal y de azul oscuro en la región post-acrosomal. La pieza intermedia puede mostrar alguna tinción roja y la cola se tiñe de azul o rojiza. Ver las figuras 3.5 y 3.6.

En el estudio, se consideró que existe un predominio de cabezas elongadas (suma de delgadas y piriformes) cuando más del 36% de las anomalías de cabeza corresponden a cabezas elongadas, delgadas si hay más de un 7% de espermatozoides delgados, predominio de residuo citoplasmático si está presente en más del 4% de los espermatozoides, microcefalia si hay más de un 21% de cabezas microcéfalas, y anomalías del acrosoma si hay más de un 88% de espermatozoides con acrosoma anormal (Voulgaridis, 2018).





**Figura 3.6. Ejemplo de captura mediante el software SCA® para la valoración de la morfología espermática.**

Coloreado de las distintas partes del espermatozoide (cabeza: acrosoma de amarillo y núcleo de azul; pieza intermedia: de verde), realizado por el módulo de morfología del sistema SCA® para valorar si el espermatozoides es normal morfológicamente.

*Permitido por SCA®, Microptic®*

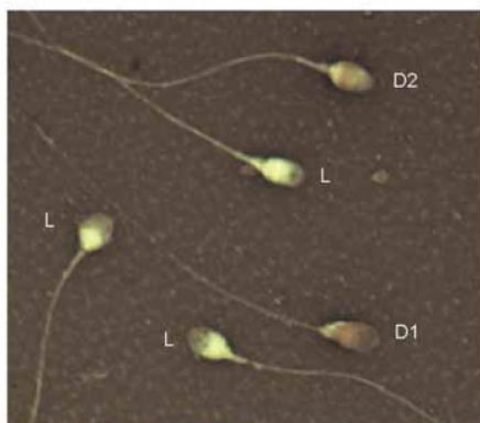
#### *3.1.2.6.6. Valoración de la vitalidad mediante la tinción de eosina-nigrosina*

Se usó la tinción de Eosina Y y Nigrosina para valorar la vitalidad mediante microscopía óptica convencional:

##### Protocolo de la tinción:

- \* Se mezclan 3,5 µL de semen licuado, bien mezclado y sin diluir con 3,5 µL de solución eosina en un portaobjetos de vidrio y se incuba durante 30 segundos.
- \* Se mezclan 3,5 µL de solución nigrosina con la mezcla anterior y se incuba otros 30 segundos.
- \* Se montan los aproximadamente 10 µL resultantes de la mezcla con un cubre de 22×22 mm y se examina al microscopio óptico de contraste de fases con objetivo 40x. Ver tabla 3.2.

\* Se valoran al menos 100 espermatozoides. Los espermatozoides blancos, sin teñir, se clasifican como "vivos", y los que poseen alguna coloración rosa o roja se clasifican como "muertos" (membrana dañada). Ver figura 3.7.



**Figura 3.7. Prueba de vitalidad eosina-nigrosina.**

Los espermatozoides con la cabeza teñida de rojo (D) o rosa oscuro (D2) se consideran muertos (tienen daño de la membrana), mientras que los que tienen la cabeza blanca (L) o ligeramente rosa se consideran vivos (membrana intacta).

WHO, 2010. Con permiso de World Health Organization Press, ID: 282070

Se expresa el resultado como la proporción de espermatozoides vivos expresado como porcentaje.

#### *3.1.2.6.7. Prueba de anticuerpos anti-espermatozoides*

##### *3.1.2.6.7.1. Prueba directa para la detección de anticuerpos unidos a los espermatozoides: reacción de antiglobulina mixta (MAR test)*

En la prueba de MAR directo se enfrentan los espermatozoides del semen sin lavar, con partículas de látex recubiertas de anticuerpos IgG o IgA en presencia de un antisuero anti-IgG o anti-IgA humana.

#### *Procedimiento:*

\* Se mezcla bien la muestra de semen.

\* Se coloca una alícuota de 3,5  $\mu\text{L}$  de semen en un portaobjetos de vidrio.

\* Se añaden 3,5  $\mu\text{L}$  de partículas de látex recubiertas de IgG a la gota de semen, y se mezcla agitando con la punta de la pipeta.

\* Se añaden 3,5  $\mu\text{L}$  de antisuero contra IgG humana a la mezcla de espermatozoides-partículas, y se mezcla por agitación con la punta de la pipeta.

\* Se cubre la suspensión con un cubreobjetos (22  $\times$  22 mm) para proporcionar una profundidad de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ .

\* Se examina la preparación con la óptica de contraste de fases a 200 ó 400x de magnificación después de 3 minutos. Ver tabla 3.2.

#### Interpretación:

- Si el espermatozoide no tiene anticuerpos IgG en su superficie, los espermatozoides se moverán sin partículas adheridas, mientras que las partículas (las cuales tienen anticuerpos en su superficie) tenderán a agruparse debido a la presencia del antisuero.
- Por el contrario, si el espermatozoide tiene anticuerpos IgG en su superficie, la anti-Ig-humana (antisuero) se unirá simultáneamente a la IgG localizada sobre las partículas y los espermatozoides. Los espermatozoides móviles se desplazarán con las partículas adheridas.

#### Expresión de resultados:

- Se puntúan sólo los espermatozoides móviles y se determina el porcentaje de aquellos que tienen dos o más partículas de látex adheridas. Se ignoran las partículas unidas a la punta de la cola.
- Se evalúan al menos 100 espermatozoides móviles a fin de lograr un error de muestreo aceptablemente bajo.
- Se calcula el porcentaje de espermatozoides móviles que tiene partículas unidas.
- Se registra la clase (IgG o IgA) y el sitio de unión de las partículas de látex a los espermatozoides (cabeza, pieza intermedia, pieza principal).

### 3.1.2.7 Estudio funcional: procedimiento de la técnica gradientes de densidad para la selección de espermatozoides

Para que los espermatozoides no pierdan funcionalidad, deben ser separados del plasma seminal rápida y eficazmente para su utilización en las distintas TRA.

Existen evidencias recientes que demuestran de forma concluyente que la población de espermatozoides separados utilizando gradientes de densidad son no sólo mucho más funcionales en términos de capacidad fecundante, sino también que tienen menos fragmentación de su DNA, lo que contribuirá a una mejor calidad de la cromatina del embrión.

Este método utiliza la centrifugación del plasma seminal a través de gradientes de densidad que consisten en partículas coloidales de sílice recubiertas de silano, las cuales separan a las células por su densidad. Además, los espermatozoides móviles nadan activamente a través del material del gradiente para formar un pellet blanquecino en el fondo del tubo. El método simple de preparación en dos pasos de gradientes de densidad discontinuos es el más ampliamente utilizado, típicamente con una capa superior de densidad del 40-50% (v/v) y una inferior de densidad del 80-90% (v/v). La preparación de los espermatozoides utilizando este método resulta en la obtención de una fracción de espermatozoides de muy buena movilidad, libre de detritus, leucocitos contaminantes, células no germinales y células germinales degeneradas.

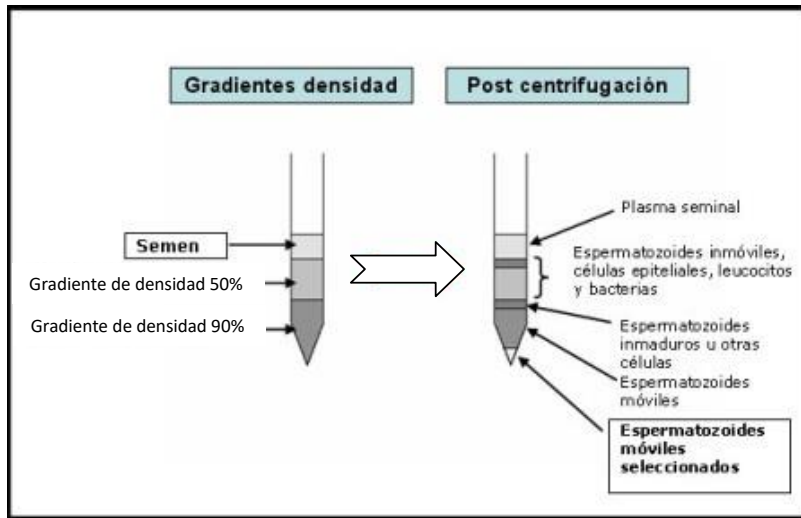
La eficacia de los métodos de preparación frecuentemente se valora en términos de espermatozoides móviles recuperados.

#### Procedimiento:

- Se utilizan tubos cónicos estériles (Falcon, 352095) para centrifugar los espermatozoides – en un rotor oscilante – maximizando la recuperación de espermatozoides.

1. Se utiliza una pipeta Pasteur estéril para dispensar la capa inferior de 1,5 ml del gradiente (Isolate<sup>®</sup>, Irvine Scientific, California, USA) del 90% en dos tubos Falcon de 15 ml. Seguidamente, se añade cuidadosamente la capa superior (cada una de 1,5 ml del gradiente de

50%) sobre la capa inferior evitando la formación de burbujas lo cual alteraría la interfase del gradiente. Se formará una clara interfase visible entre ambas fracciones. Ver figura 3.8 gradientes densidad.



**Figura 3.8 Técnica de gradientes de densidad**

Carga de los tubos cónicos para la realización de la técnica de gradientes de densidad pre centrifugación, y posterior distribución de los distintos elementos celulares del semen post-centrifugación. Este método utiliza la centrifugación del plasma seminal a través de gradientes de densidad que consisten en partículas coloidales de sílice recubiertas de silano, las cuales separan a las células por su densidad.

2. Se utiliza una pipeta Pasteur estéril para colocar la capa de semen licuado cuidadosamente sobre la capa superior de gradiente del 50% (ambos gradientes deben estar a T<sup>a</sup> ambiente al igual que la muestra de semen). El volumen de semen dependerá de la calidad del semen (hasta 2 ml de semen por gradiente).
3. Se centrifugan a 300 g durante 20 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
4. Se aspira cuidadosamente el plasma seminal, la capa de gradiente del 50%, la interfase y la mayoría del gradiente del 90% y se desechan; manteniendo el sedimento intacto. Utilizando una pipeta Pasteur estéril limpia, se retira el pellet de cada uno de los gradientes por aspiración directa (máximo de 0,5 ml) del fondo del tubo intentando

aspirar la menor cantidad posible del gradiente del 90%. Ver la figura 3.8 Post centrifugación.

5. Se transfieren ambos pellets a un nuevo tubo cónico estéril y se resuspenden en 4 ml de medio de lavado (*Multipurpose Handling Medium*® -Complete (MHM®-C) with Gentamicin, Irvine Scientific, California, USA).

6. Se centrifuga nuevamente a 500 g durante 10 minutos.

7. Se aspira el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril y se resuspende el pellet primeramente en una pequeña fracción de medio de cultivo de espermatozoides (0,1 ml de MHM). Para posteriormente transferir el pellet resuspendido a un tubo de cultivo pequeño (Falcon 352003) donde se llevará hasta 0,3 – 1 ml de medio según la calidad del pellet. Se coloca el recuperado REM a temperatura ambiente. Se valora la concentración y la movilidad de la preparación lavada de espermatozoides utilizando el sistema SCA® (Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, España).

### 3.1.3. Técnicas microbiológicas

#### 3.1.3.1. Observación microscópica

##### 3.1.3.1.1 Frotis teñidos

Para la observación de bacterias se procedió a teñir los frotis de semen mediante la tinción de Gram (Hans Christian Gram, 1884). Se trata de una tinción diferencial que permite observar la morfología bacteriana y diferenciar las bacterias en función de las características de su pared celular. De forma resumida consiste en utilizar el cristal violeta como colorante y el yodo como mordiente de manera que el colorante queda fijado a la pared celular bacteriana. El lavado con una mezcla de alcohol-acetona arrastra el colorante en aquellas bacterias que poseen una membrana externa (gram negativas) y no en las que carecen de ella (gram positivas). La safranina se utiliza como colorante de contraste de forma que las bacterias gram positivas aparecen teñidas de azul intenso y las gram negativas de rosa. Por supuesto, aquellas bacterias que carecen de pared celular como son los micoplasmas no podrán ser observadas mediante esta tinción. Aunque



no es específica para hongos, estos pueden ser visualizados en el Gram. Tampoco es una tinción para diferenciación celular pero permite distinguir los leucocitos PMN y algunos otros tipos celulares.

#### 3.1.3.1.1.1. *Protocolo de la tinción de Gram*

- \* Se fija el material sobre un portaobjetos con calor. Se deja enfriar.

- \* Se cubre el portaobjetos con cristal violeta y se deja en contacto durante 1 minuto.

- \* Se añade lugol y se espera 1 minuto.

- \* Se lava con agua.

- \* Se cubre el portaobjetos con la solución decolorante (alcohol-acetona al 70%) y se espera 1 minuto.

- \* Se aclara con agua y se deja secar.

La observación microscópica se realiza a 400x en aproximadamente 25 campos. La presencia de PMN se valora de forma semicuantitativa en las siguientes categorías:

- \* Ninguna: no se observan PMN en 25 campos.

- \* Ocasional: menos de 3 PMN por 25 campos.

- \* 1+: más de 3 PMN por extensión pero menos de 1 PMN por HPF.

- \* 2+: de 1 a 4 PMN por HPF.

- \* 3+: de 5 a 30 PMN por HPF.

- \* 4+: más de 30 PMN por HPF.

Para una evaluación más detallada de los campos, se utiliza el objetivo de inmersión (1000x) en campo brillante (ver figura 1.4).

#### 3.1.3.2. Detección de microorganismos por PCR en tiempo real

##### 3.1.3.2.1. *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*

La PCR se realizó mediante el sistema automatizado de extracción, amplificación y detección en tiempo real cobas® 4800

CT/NG (Roche, Suiza) que utiliza los cebadores CP102 y CP103 para definir una secuencia de aproximadamente 206 nucleótidos dentro del ADN plasmídico críptico de *C.trachomatis*. Además, utiliza los cebadores CTMP101 y CTMP102 para definir una secuencia de aproximadamente 182 nucleótidos del ADN cromosómico de *C.trachomatis*. El límite de detección es de 0,75 UFI (unidades formadoras de inclusión) /mL.

El reactivo del sistema cobas® 4800 CT/NG (Roche, Suiza) permite la detección simultánea de *N.gonorrhoeae*. Por lo que, aunque esta puede recuperarse sin ningún problema en los cultivos convencionales, también fue ensayada por PCR. En este caso, el fragmento objetivo para *N.gonorrhoeae* es una región de repetición directa altamente conservada denominada DR-9. La prueba cobas® 4800CT/NG utiliza los cebadores NG514 y NG519 para definir una secuencia de aproximadamente 190 nucleótidos de esta región. Además, usa otro conjunto de cebadores para NG552 y NG579 para definir una segunda secuencia de aproximadamente 215 nucleótidos identificados como una variante de secuencia conservada de esta región. El límite de detección es de 3 UFC (unidades formadoras de colonias) /mL.

La sensibilidad y especificidad en ambos casos está por encima del 95%.

La muestra empleada en hombres y mujeres fue orina de la primera porción (definida como los primeros 10 a 15 ml del volumen expulsado, O1) tras un mínimo de 2 horas sin orinar y recogida en frasco estéril sin conservantes. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento.

#### 3.1.3.2.2. *M.genitalium/hominis* y *U.urealyticum/parvum*

Dado que los micoplasmas genitales no se recuperan en los cultivos convencionales requiriéndose condiciones especiales y largos tiempos de incubación, se decidió realizar la detección de los mismos mediante PCR en tiempo real que, además, tiene una mayor sensibilidad.

La detección de micoplasmas genitales se realizó por PCR en tiempo real en la plataforma LightCycler 2.0 (Roche, Suiza) con los

reactivos LightMix Kit Mycoplasma gen/hom & Ureaplasma (TIB MOLBIOL, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante modificado para incrementar la sensibilidad. Brevemente el procedimiento fue el siguiente:

- \* Se centrifugan 2 mL de orina durante 20 minutos a 14.000 x g.
- \* Se retira el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 200  $\mu$ L de orina los cuales se utilizan para cargar en el sistema de extracción.
- \* Se extraen los ácidos nucleicos mediante el sistema MagNa Pure Compact (Roche, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La elución se realizó en 50  $\mu$ L.
- \* Se amplifican los ácidos nucleicos de acuerdo con las condiciones del fabricante en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L: agua, 1,1  $\mu$ L;  $MgCl_2$ , 2,4  $\mu$ L; cebadores y sondas para la diana, 2  $\mu$ L; cebadores y sondas para el control interno, 2  $\mu$ L; control interno, 0,5  $\mu$ L; Taq polimerasa, 2  $\mu$ L; ADN, 10  $\mu$ L.

#### 3.1.3.2.3. *Virus del papiloma humano (VPH)*

Muestras:

- Mujeres: exudado endocervical recogido por cepillado y enviado al laboratorio en medio de transporte/conservación (PreservCyt, Hologic, EEUU).
- Hombres: semen recogido por eyaculación y diluido (100  $\mu$ L de semen en 3,2 mL de tampón fosfato salino (PBS) estéril).

La detección de VPH se realizó en el sistema automatizado Cobas 4800 HPV (Roche, Suiza) con primers de la región L1 del VPH. El reactivo de mezcla maestra de la prueba cobas® 4800 HPV contiene pares de cebadores y sondas específicos para el ADN de los 14 genotipos de VPH de alto riesgo y de la  $\beta$ -globina humana que se utiliza como control interno. La detección del ADN amplificado se lleva a cabo durante los ciclos térmicos con ayuda de sondas de oligonucleótidos con cuatro marcadores fluorescentes distintos. La señal amplificada de doce de los genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) se detecta con el mismo marcador

fluorescente, mientras que las señales del VPH16 y VPH18 y de la  $\beta$ -globina se detectan con marcadores fluorescentes específicos.

#### 3.1.3.3. Cultivo bacteriano

El diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana se realizó con cultivos cuantitativos y comparativos de diferentes fracciones de la orina y semen como se describe en la tabla 3.1.

En la Tabla 3.3 se resumen las características fundamentales de los medios utilizados, siendo todos ellos del fabricante Becton-Dickinson (EEUU), excepto el Roiron que es del fabricante BioMérieux (Francia).

En la tabla 3.3 se resumen las condiciones de siembra e incubación para la realización de los cultivos en cada una de las muestras evaluadas.

#### 3.1.3.4. Interpretación de los hallazgos de los cultivos, umbral de positividad

La interpretación del crecimiento obtenido en los cultivos se realizó según los criterios de la Sociedad Francesa de Microbiología (Courcol R, 2010) adaptados al protocolo de siembra (tabla 3.4).

El aislamiento de tres o más tipos distintos de microorganismos en proporción similar se interpretó como: MUESTRA CONTAMINADA.

#### 3.1.3.5. Identificación bacteriana

Los aislamientos bacterianos se identificaron a nivel de especie por espectrometría de masas (MALDI TOF proteómica) usando sistema MALDI biotyper (MS) (Bruker Daltonics, Alemania).

#### 3.1.3.6. Antibiógrama

A continuación se exponen los medios disponibles para el ensayo de la sensibilidad a los antibióticos en los casos indicados aunque, como se verá más adelante, no hubo ninguno.

**Tabla 3.3. Medios de cultivo utilizados para el estudio de ITREM en las muestras de orina y semen.**

Frasco (porción)	Asa de siembra (volumen se siembra)	Medios de cultivo (atmósferas de incubación)	Temperatura de incubación/Luz/humedad	Tiempo de incubación
<b>Frasco 1:</b> 10 mL del primer chorro orina (O1).	10µL	Agar sangre (5% CO <sub>2</sub> )	37°C/ oscuridad/ humedad a saturación	72h
<b>Frasco 2:</b> 10 mL orina micción media (O2)	10µL	Agar sangre (5% CO <sub>2</sub> )	37°C/ oscuridad/ humedad a saturación	72h
<b>Frasco 3:</b> semen (SE)	* 10µL en cada placa ----- * 0,5 mL en tioglicolato * 0,5 mL en Roiron	Agar sangre (5% CO <sub>2</sub> ) Agar chocolate (5% CO <sub>2</sub> ) Tioglicolato (aerobiosis) Schaedler anaerobiosis (anaerobiosis) Agar Sabouraud con clo-ranfenicol (aerobiosis) Roiron (aerobiosis) * Porta (para observación con tinción de Gram)	37°C/ oscuridad/ humedad a saturación (5% CO <sub>2</sub> ) o ambiente (aerobiosis y anaerobiosis)	72h
<b>Frasco 4:</b> 10 mL orina posteyaculado (O3)	10µL	Agar sangre (5% CO <sub>2</sub> )	37°C/ oscuridad/ humedad a saturación	72h

\* Se inoculan 10 µL de semen en cada una de las placas de cultivo (500 µL en medio Roiron para *T.vaginalis* y en el caldo tioglicolato) y se siembran para cuantificación. El número de colonias observadas multiplicado por 100 es el n° de UFC/mL. Alternativamente, puede diluirse previamente el semen en suero fisiológico 1/10, para eliminar potenciales sustancias bactericidas, sembrándose a continuación 100 µL por placa.

**Notas:**

1. Todas las placas se siembran para conteo.
2. Aerobiosis: aire ambiental que contiene normalmente 21% de O<sub>2</sub>.
3. Agar sangre, agar chocolate y caldo tioglicolato aerobiosis (microaerofilia): atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>.
4. Schaedler en atmósfera de anaerobiosis (5% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>).
6. Se deben obtener muestras antes de administrar la terapia antimicrobiana.

Tabla 3.4. Criterios de positividad para el cultivo de las muestras de orina O1, O2 y O3, así como del semen

CONTAMINACIÓN	> 3 MORFOLOGÍAS DISTINTAS SIN PREDOMINIO (Microbiota polimicrobiana) CUALQUIER RECuento
PRESENCIA	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
$\geq 5 \times 10^2$ UFC/mL *	Enterobacterias ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> ), <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
$\geq 5 \times 10^3$ UFC/mL *	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>
$\geq 10^4$ UFC/mL *	<i>Corynebacterium seminale</i> (= <i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> ) <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Anaerobios gram negativos</i> ( <i>Fusobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> ) <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Candida albicans</i>
$\geq 10^4$ UFC/mL **	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprofiticus</i> ) <i>Corynebacterium spp.</i> ( <i>Corynebacterium urealyticum</i> , <i>Corynebacterium seminale</i> ) <i>Streptococcus viridans</i> Bacilos gram negativos no fermentadores ( <i>Acinetobacter baumannii</i> )
$\geq 10^4$ UFC/mL ***	Mycoplasmas genitales ( <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> )

Abreviaturas: UFC, unidades formadoras de colonias.

\*en cultivo puro o como población dominante, siempre que se cumplan los criterios de Meares y Stamey

\*\*en cultivo puro en dos cultivos sucesivos, siempre que se cumplan los criterios de Meares y Stamey

\*\*\* si se usan técnicas moleculares habrá que hablar de copias/mL y estudiar su correspondencia con el recuento bacteriano

Los métodos disponibles para el ensayo de sensibilidad a los antibióticos fueron:

### 3.1.3.6.1. Microdilución en caldo

Mediante MicroScan Walkaway plus System (Beckman Coulter, EEUU) para bacterias aerobias sin requerimientos nutricionales especiales: paneles NC69 (enterobacterias), NUC71 (bacilos gram negativos no fermentadores de glucosa), PC42 (estafilococos y enterococos).

### 3.1.3.6.2. Difusión en agar

Mediante tiras con gradiente de concentración de antibiótico (Etest, BioMerieux, Francia) para microorganismos con requerimientos nutricionales especiales o levaduras.

Condiciones de cultivo:

- *Haemophilus spp.*: HTM medium (Becton Dickinson, EEUU), inóculo 0,5 McFarland, incubación 18 horas, 35° C, atmósfera enriquecida en 5% de CO<sub>2</sub>.

- *Neisseria gonorrhoeae*: Agar chocolate II (Becton Dickinson, EEUU), inóculo 0,5 McFarland, incubación 18 horas, 35° C, atmósfera enriquecida en 5% de CO<sub>2</sub>.

- *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* y otros microorganismos microaerofílicos: Müller Hinton agar 5% sangre de cordero (Becton Dickinson, EEUU), inóculo 0,5 McFarland, incubación 18 horas, 35° C, atmósfera enriquecida en 5% de CO<sub>2</sub>.

- Bacterias anaerobias: Brucella agar con hemina y vitamina K1 (Becton Dickinson), inóculo 0,5 McFarland, incubación 48 horas, 35° C, atmósfera enriquecida anaerobia (80-90% de nitrógeno, 5-10% de hidrógeno y 5-10% de CO<sub>2</sub>).

- *Candida spp.*: RPMI agar suplementado con 2% de glucosa, inóculo 0,5 x 10<sup>5</sup> - 2,5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL.

En la tabla 3.5 se describen los antibióticos ensayados.

La interpretación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) por mililitro para su inclusión en las categorías de sensible, intermedio o resistente se hizo según los criterios del CLSI (CLSI M100-S26, 2016).

**Tabla 3.5. Antibióticos ensayados para la realización del antibiograma.**

<b>Enterobacterias</b>	Ampicilina	<b>BGNMF</b>	Ciprofloxacino
	Amoxiclavulánico		Cotrimoxazol
	Cefuroxima	<b>Enterococos</b>	Ampicilina
	Ciprofloxacino		Levofloxacino
	Cotrimoxazol		Tetraciclina
	Piperacilina/ tazobactam		Gentamicina de alto nivel
	Cefotaxima		Amoxiclavulánico
	Cefoxitina		Eritromicina
	Ceftazidima	<b>Estreptococos</b>	Amoxicilina
	Cefepime		Eritromicina
	Ertapenem		Clindamicina
	Imipenem		Levofloxacino
	Gentamicina	<b>Corinebacterias</b>	Amoxiclavulánico
	Tobramicina		Eritromicina
	Amikacina		Clindamicina
	Nitrofurantoina		Levofloxacino
	Fosfomicina		Cotrimoxazol
<b>Estafilococos</b>	Oxacilina	<b>Haemophilus</b>	Ampicilina
	Amoxiclavulánico		Amoxiclavulánico
	Gentamicina		Cefuroxima
	Penicilina		Azitromicina
	Rifampicina		Levofloxacino
	Vancomicina		Cotrimoxazol
	Teicoplanina	<b>Anaerobios</b>	Penicilina (gram +)
	Linezolid		Amoxiclavulánico
	Daptomicina		Cefoxitina
	Eritromicina		Ertapenem
	Clindamicina		Clindamicina
	Levofloxacino		Moxifloxacino
	Cotrimoxazol		Metronidazol
		<b>Candida</b>	Fluconazol

*Abreviaturas:* BGNMF, Bacilos Gram Negativos No Fermentadores.

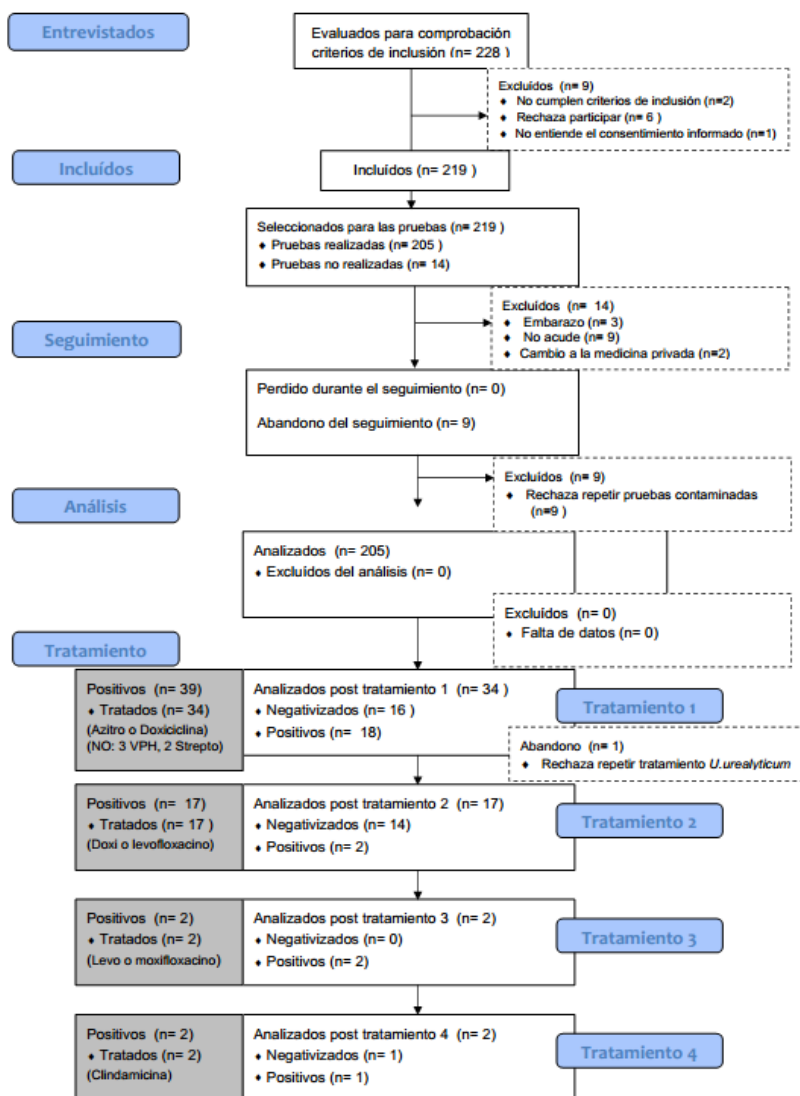


## 4 RESULTADOS

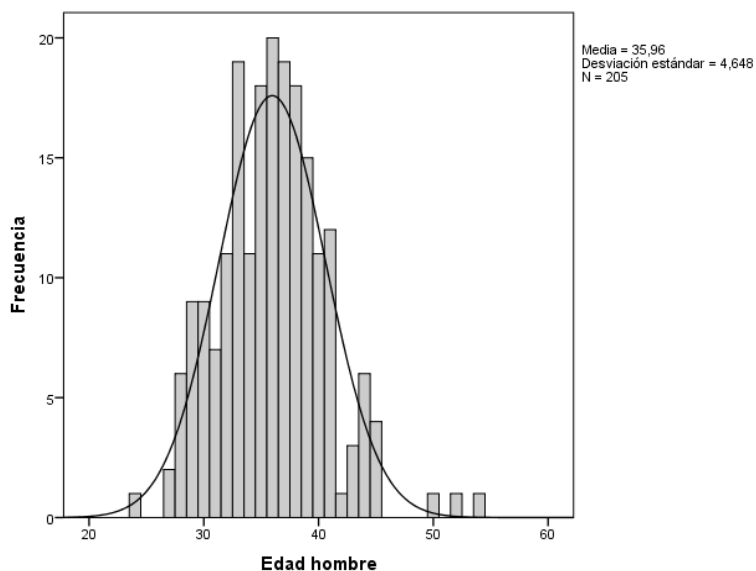
### 4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO (VER TABLA 4.1)

Se reclutaron 228 hombres, de los cuales se excluyeron 23 (ver esquema 4.1).

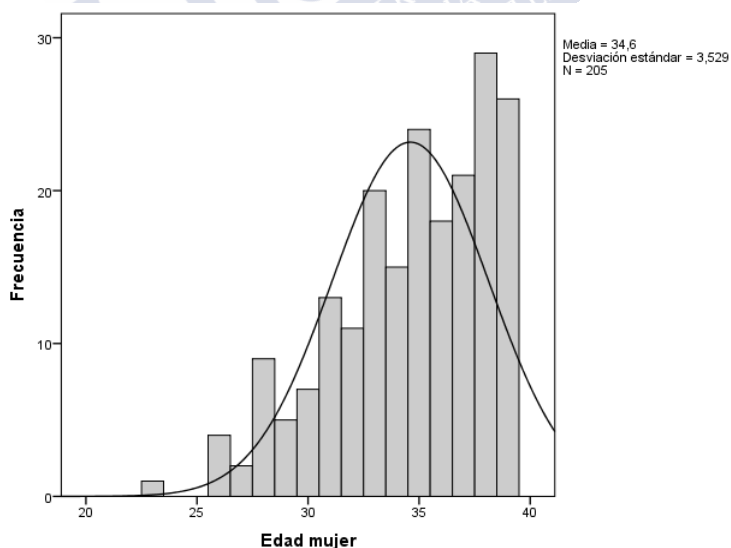
El rango de edad fue de 24 a 54 años en los hombres con una mediana de 36 (rango intercuartílico = 33 a 39) y de 23 a 39 en las mujeres con una mediana de 35 (rango intercuartílico = 32 a 38) (Figuras 4.1 y 4.2, respectivamente). La edad media de los hombres fue de 35,96 años y la mayoría estaban incluidos en la franja de edad de los 35 a los 44 años (60%). El grupo racial mayoritario en los hombres es la raza caucásica (202/205, 98,5%), siendo minoritarias la raza americana (2/205, 1%), gitana (1/205, 0,5%).



**Esquema 4.1. Participantes en el estudio**  
 Flujo de los participantes y finalización del estudio. *Consort, Transparent reporting of trials, CONSORT 2010 Flow Diagram*



**Figura 4.1. Histograma de los valores de la edad de los hombres estudiados.**  
Se superpone la curva de distribución normal de los valores de la edad de los hombres estudiados.



**Figura 4.2. Histograma de frecuencia de la edad de las mujeres.**  
Se superpone la curva de distribución normal de los valores de la edad de las mujeres estudiadas.

Tabla 4.1. Datos demográficos y clínicos de la población a estudio (n= 205)

DEMOGRÁFICOS	Valor
<sup>a</sup> Edad (años) hombres	36 (24-54)
	35,96 ± 4,65
< 25 años	1 (0,5)
25-34 años	74 (36,1)
35-44 años	123 (60)
45-54 años	7 (3,4)
<sup>a</sup> Edad (años) mujeres	35 (23-39)
	34,6 ± 3,53
< 25 años	1 (0,5)
23-33 años	71 (34,6)
34-39 años	133 (64,9)
<b>Raza hombres</b>	
Caucásica	202 (98,5)
Americana	2 (1)
Gitana	1 (0,5)
CLÍNICOS	Valor
<b>Parejas sexuales en el último año</b>	
1	205 (100)
<b>Serología de VIH, VHB, VHC y sífilis hombres y mujeres</b>	
Seronegativa	205 (100)
<b>Uso antibiótico/antifúngico &lt; 30 días pre toma muestras, hombres y mujeres</b>	
No	205 (100)
<b>ITS previas hombres</b>	
No	205(100)
<b>ITS previas mujeres</b>	
No	198 (96,6)
Sí	7 (3,4)
VPH	3 (1,5)
<i>Streptococcus agalactiae</i> Grupo B	2 (1)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1 (0,5)
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Candida</i>	1 (0,5)

CLÍNICOS	Valor
<b>Tipo de esterilidad</b>	
Primaria	189 (92,2)
Secundaria	16 (7,8)
<b><sup>a</sup>Duración de la esterilidad (meses)</b>	24 (0-108)
	29,99 ± 17,35
<b>Diagnóstico de esterilidad</b>	
Masculina	59 (28,8)
Femenina	56 (27,3)
Mixta	32 (15,6)
EOD	58 (28,3)
<sup>b</sup> Mujer sola	28
<sup>b</sup> Pareja homosexual	6
<sup>b</sup> Serodiscordantes	2
<sup>b</sup> DGP	5
<b>Tabaco</b>	
No fumadores	151 (73,7)
Fumadores (1-20 cigarrillos/día)	54 (26,3)
<b>Alcohol (≥ 28 unidades/semana)</b>	
No	203 (99)
Sí	2 (1)

*Abreviaturas:* VIH, Virus de la Inmunodeficiencia Humana; VHB, Virus de la Hepatitis B; VHC, Virus de la Hepatitis C; ITS, Infección de Transmisión Sexual; VPH, Virus del Papiloma Humano; EOD, Esterilidad de Origen Desconocido; DGP, Diagnóstico Genético Preimplantacional.

<sup>a</sup>Variable cuantitativa [media (rango intercuartílico); media ± desviación estándar].

<sup>b</sup>No incluidos para entrevista por no cumplir criterios de inclusión.

#### 4.1.1 Estudio microbiológico

Todos los participantes tuvieron una única pareja sexual en el último año. En todos los casos la serología para VIH, VHB, VHC y sífilis fue negativa y ninguno de ellos recibió tratamiento antibiótico en los 30 días anteriores a la toma de muestras objeto de estudio. En cuanto a otras infecciones del tracto genitourinario, sólo se encontraron descritas en la historia clínica 5 casos, todos ellos en mujeres: 3 por VPH, 1 por *Gardnerella vaginalis*, y 1 por *G.vaginalis* junto con *Candida spp.*

#### 4.1.2 Estudio de esterilidad

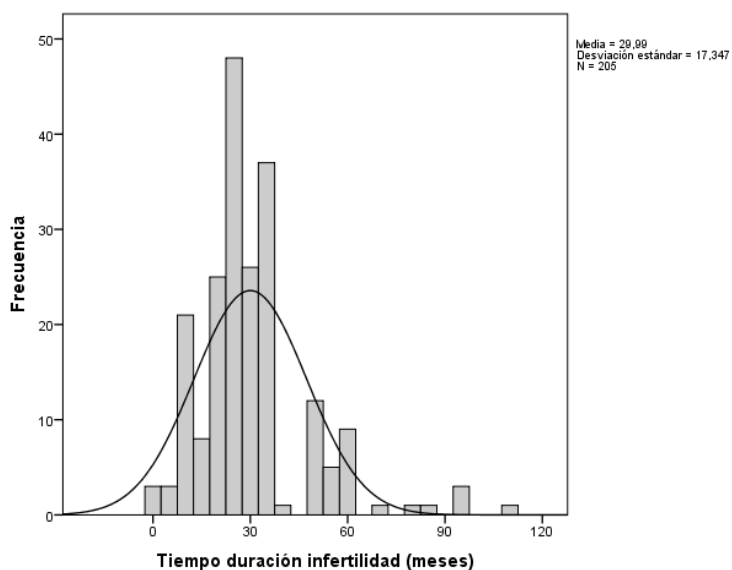
El tipo de esterilidad encontrado en la mayoría de los casos fue de tipo primario (189, 92,2%).

La duración de la esterilidad media fue de 29,99 meses, con una mediana de 24 meses (rango intercuartílico = 18 a 36) (ver figura 4.3).

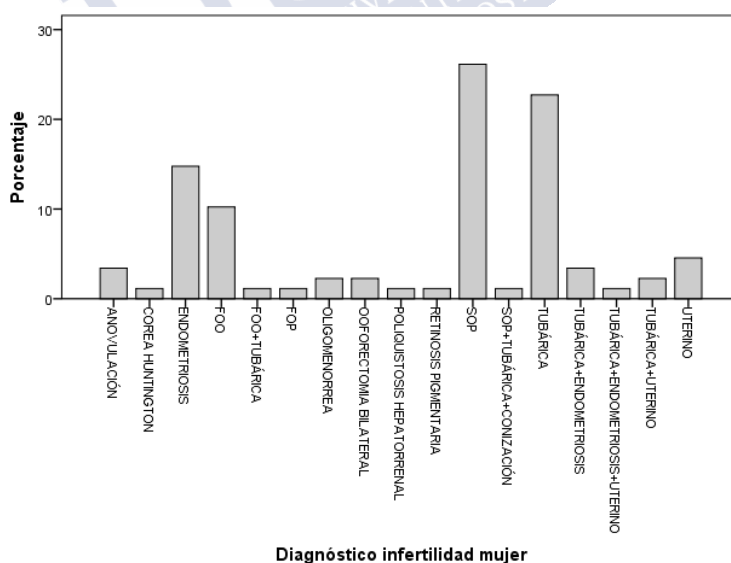
Las causas de esterilidad se distribuyeron entre el factor masculino (28,8%), femenino (27,3%), y de origen desconocido (EOD, 28,3%) siendo la que afecta a ambos miembros (mixta) del 15,6%.

Las causas de esterilidad más frecuentes en la mujer fueron: síndrome de ovario poliquístico (SOP), 23 casos (26,1%); factor tubárico puro, 20 casos (22,7%); endometriosis, 13 casos (14,8%) y fallo ovárico oculto (FOO), 9 casos (10,2%). (Figura 4.4)

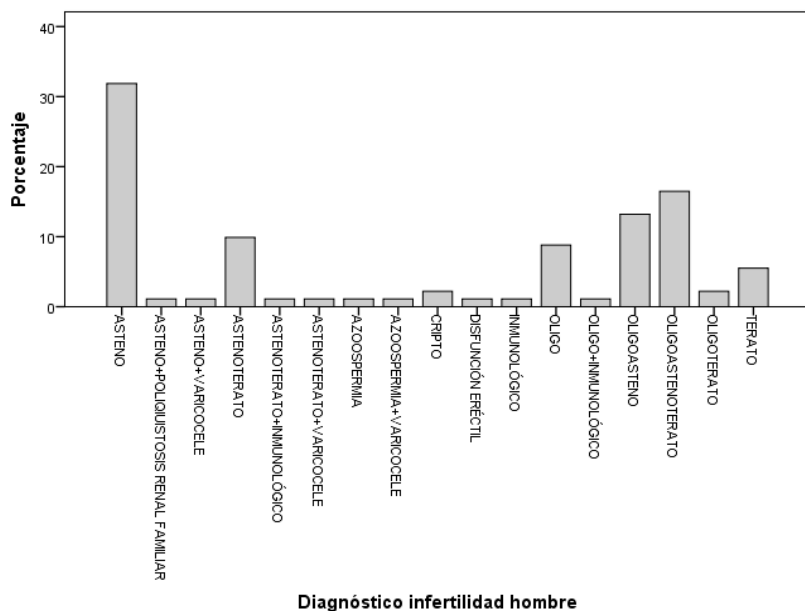
En el caso del varón, se encontraron los siguientes diagnósticos: astenozoospermia, 29 casos (31,9%); oligoastenoteratozoospermia, 15 casos (16,5%); oligoastenozoospermia, 12 casos (13,2%), astenoteratozoospermia, 12 casos (13,2%); astenoteratozoospermia 9 (9,9%), oligozoospermia 8 (8,8%), criptozoospermia 2 (2,2%), azoospermia 2 (2,2%), disfunción eréctil 1 (1,1%), e inmunológico 1 (1,1%). (Figura 4.5)



**Figura 4.3. Histograma de frecuencia de la duración en meses de la esterilidad en la pareja.**  
Se superpone la curva de distribución normal de los valores en meses de esterilidad en la pareja.



**Figura 4.4. Causas de esterilidad de tipo femenino**  
Se describe el porcentaje de cada uno de los factores de infertilidad femenina.



**Figura 4.5. Causas de esterilidad de tipo masculino**

Se describe el porcentaje de cada uno de los factores de infertilidad masculina.

#### 4.1.3 Consumo de tóxicos

La mayoría de los hombres son no fumadores (151, 73,7%) y sólo dos (1%) son consumidores habituales de alcohol.

El 26,3% (54/205) de los hombres comunicaron un consumo habitual de tabaco que se consideró excesivo en el 18,5% (38/54).

Sólo 2 (1%) casos declararon consumir alcohol en cantidad superior a 28 U/semana.

#### 4.2 TINCIÓN DE GRAM DEL SEMEN

En todos los casos la tinción de gram realizada a las muestras de semen no aportó mayor información que la obtenida mediante los cultivos de las muestras del protocolo Meares y Stamey.



### 4.3 *T. VAGINALIS* EN EL SEMEN

En ningún caso se detectó *T.vaginalis* en las muestras de semen tras cultivo.

### 4.4 PROTOCOLO MEARES-STAMEY MODIFICADO

#### 4.4.1 Cultivos con microbiota abundante

En la tabla 4.2 se muestran los sujetos varones con informe de cultivo contaminado por crecimiento de  $\geq 3$  microorganismos (14/205, 6,8%) En estos casos se recomendó la repetición del cultivo para confirmación de contaminación o negativización del mismo. En 5 sujetos la repetición de los cultivos confirmó que previamente hubo una contaminación probablemente por mala asepsia durante la recogida dado que los nuevos cultivos resultaron negativos. En 7 sujetos no fue posible la repetición porque no acudieron a la cita y rechazaron la confirmación. Y en 2 sujetos la nueva recogida resultó con resultados nuevamente de probable contaminación, rechazando la realización de una tercera recogida uno de los sujetos y otro no acude.

**Tabla 4.2. Cultivos con resultado de microbiota abundante en O1, O2, semen u O3 con recomendación del laboratorio de Microbiología de repetir la toma de muestra para confirmación de contaminación o no.**

ID. SUJETO	1ª MUESTRA	2ª MUESTRA	3ª MUESTRA	MOTIVO
74	CONTAMINADO (O1, O2, SE, O3)	NEGATIVO		
117	CONTAMINADO (O1, SE)	NEGATIVO		
119	CONTAMINADO (O1, SE)	NEGATIVO		
130	CONTAMINADO (O1, O2, SE, O3)	NEGATIVO		
173	CONTAMINADO (O1, O2, SE, O3)	NEGATIVO		
16	CONTAMINADO (O1, SE)	NO REPITE		No acude
98	CONTAMINADO (SE)	NO REPITE		No acude

ID. SUJETO	1ª MUESTRA	2ª MUESTRA	3ª MUESTRA	MOTIVO
100	CONTAMINADO (O1, SE)	NO REPITE		No acude
139	CONTAMINADO (SE)	NO REPITE		No acude
157	CONTAMINADO (O1, SE)	NO REPITE		No acude
191	CONTAMINADO (SE)	NO REPITE		No acude
199	CONTAMINADO (SE)	NO REPITE		No acude
197	CONTAMINADO (O1, O2, SE, O3)	CONTAMINADO (O1, SE)	NO REPITE	No acude
202	CONTAMINADO (O1, O2, SE, O3)	CONTAMINADO (SE, O3)	NO REPITE	Rechaza nueva recogida

Abreviaturas: como en la tabla 3.1.

#### 4.4.2 Resultados del cultivo convencional

El número de pacientes y porcentajes de aislamiento de microorganismos patógenos en cultivo puro de 205 varones en estudio de esterilidad en la URHA del CHUS, con título  $> 10^3$  y con microorganismos patógenos fue de 2 (1%) siendo positivo en todas las fracciones analizadas, primera fracción de orina (O1), fracción media (O2), semen (SE) y primera fracción de orina post-eyaculado (O3). En la tabla 4.3 se describe el recuento bacteriano en las distintas muestras de ambos casos.

**Tabla 4.3. Recuento de colonias (UFC/mL) en cultivos con aislamiento de 1 microorganismo puro (*Streptococcus grupo viridans* (1)) en O1, O2, SE y O3.**

Nº de caso	O1	O2	SE	O3
4	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000
162	>10.000	1.000	>10.000	1.000

Abreviaturas: como en la tabla 3.1.

Interpretados todos los resultados de los distintos cultivos (O1, O2, SE y O3) en su conjunto, ninguno de los participantes a estudio de prostatitis empleando el protocolo modificado de Meares-Stamey (cambio de fluido prostático por semen) propuesto en el estudio,

cumplió los criterios de positividad para prostatitis de Meares y Stamey.

#### 4.5 ANTIBIOGRAMA

Al no existir ninguna positividad en el cultivo convencional para prostatitis, no fue necesario realizar antibiograma ni pautar tratamiento antibiótico.

#### 4.6 ESTUDIO DE MICOPLASMAS (EN O1)

Del total de los 205 varones estudiados, 33 (16,1%) fueron positivos por qPCR para alguno de los micoplasmas estudiados: 31 para *U.urealyticum* (15,1%), 8 para *M.hominis* (3,9 %). No hubo ninguna muestra positiva para *M.genitalium*.

#### 4.7 TRATAMIENTO DE MICOPLASMAS (EN O1)

##### 4.7.1 Tratamiento de *U.urealyticum/parvum*

##### 4.7.1.1 Azitromicina

En los 12 primeros casos positivos para *Ureaplasma spp* se administró azitromicina (1 g vía oral en dosis única). Como puede verse en la tabla 4.4, el tratamiento con dicho antibiótico fue ineficaz en todos los casos por lo que se decidió cambiar a doxiciclina (100 mg vía oral, dos veces al día durante siete días) como tratamiento de primera elección en las restantes 19 parejas. En este grupo, el tratamiento fue eficaz en 15 de ellas (79%).

**Tabla 4.4. Número de fallos terapéuticos dependiendo del antibiótico utilizado inicialmente en los pacientes positivos para *U.urealyticum/parvum***

Tratamiento (N)	HOMBRES	MUJERES	PAREJAS
AZITROMICINA (12)	1	8	3
DOXICICLINA (19)	0	3	1

En la tabla 4.5 se resumen los resultados de los controles realizados tras los sucesivos tratamiento para *Ureaplasma spp.*

**Tabla 4.5. Antibióticos utilizados frente a *Ureaplasma spp.* y resultados del control postratamiento en los casos en que hubo fracaso terapéutico**

1 <sup>er</sup> Tratamiento	2 <sup>o</sup> Tratamiento	ID. Pareja	q-PCR post- tratamiento	3 <sup>er</sup> Tratamiento	q-PCR post- tratamiento	4 <sup>o</sup> Tratamiento	q-PCR post- tratamiento
Azitromicina	No	9					
Azitromicina	Doxiciclina	10	Positivo	Levofloxacino	Positivo	Clindamicina	Negativo
		12	Negativo				
		25	Negativo				
		28	Negativo				
		29	Negativo				
		31	Negativo				
		36	Negativo				
		39	Negativo				
		43	Negativo				
		46	Negativo				
		48	Negativo				
Doxiciclina	Levofloxacino	104	Negativo	Moxifloxacino *	Negativo		
		106	Negativo				
		130	Negativo				
		159	Positivo	Clindamicina	Positivo	Clindamicina + Probiotico	Positivo

Abreviaturas: como en la tabla 3.1. \*para la erradicación de *M. hominis*

De las 12 parejas en las que fracasó el tratamiento con azitromicina, una abandonó el programa (el hombre revocó la firma del consentimiento a posteriori por lo que se excluyó del estudio a pesar de tener los resultados). Las once restantes fueron tratadas con doxiciclina (100 mg vo, cada 12 horas, 7 días). Solo en un caso no se consiguió la erradicación por lo que se decidió un nuevo ciclo de tratamiento, esta vez con levofloxacino (500 mg/día, 7 días). Tras la falta de respuesta en la mujer se decidió usar clindamicina 100 mg al día durante tres días, vía vaginal, consiguiendo, finalmente, resultados negativos.

#### 4.7.1.2 Doxiciclina

En 4 parejas de 19 tratadas inicialmente con doxiciclina hubo de aplicarse tratamiento alternativo (levofloxacino (500 mg/día, una vez al día, 7 días) debido a la ineficacia de este antibiótico. Una de las mujeres no respondió al tratamiento con levofloxacino y, a pesar del tratamiento con óvulos vaginales de clindamicina (100mg) en dos ciclos sucesivos junto con probióticos en el segundo de ellos, no se consiguió la eliminación.

#### 4.7.2 Tratamiento de *M.hominis*

Los casos de infección por *M. hominis* (6/8 de ellos en coinfección con *U.urealyticum/parvum*, 75%) se trataron con azitromicina (las dos primeras parejas porque tenían coinfección con *U. urealyticum*) y doxiciclina (las seis restantes). El tratamiento con azitromicina no fue efectivo en 3 pacientes (2 de ellos miembros de la misma pareja), y lo mismo ocurrió con el tratamiento con doxiciclina (Tabla 4.6).

Una de las parejas (nº 104) tuvo que ser tratada con moxifloxacino (400 mg vo, una vez al día, 7 días) para eliminar *M.hominis* encontrado en el control postratamiento con levofloxacino para la eliminación de *Ureaplasma spp.*

**Tabla 4.6. Número de fallos terapéuticos dependiendo del antibiótico utilizado para el tratamiento inicial en pacientes positivos para *M.hominis***

Tratamiento (N)	HOMBRES	MUJERES	PAREJAS
AZITROMICINA (2)	0	1	1
DOXICICLINA (6)	0	1	1

El análisis estadístico demuestra que existe una peor respuesta al tratamiento en el grupo de las mujeres ( $p < 0,01$ ) observándose también, menor eficacia de azitromicina frente a doxiciclina ( $p < 0,01$ ) tanto en hombres como en mujeres.

La eficacia del tratamiento fue una variable independiente de la edad si bien el rango de edades es demasiado pequeño como para poder observar diferencias significativas.

#### **4.8 ESTUDIO DE *C.TRACHOMATIS* (EN O1)**

Se detectó *C.trachomatis* en 2 casos (1 %) sin coinfección. La pareja fue tratada con éxito con doxiciclina 100 mg vía oral, dos veces al día durante 7 días.

#### **4.9 ESTUDIO DE *N.GONORRHOEAE* (EN O1)**

No se detectó ninguna infección por *N.gonorrhoeae*.

#### **4.10 ESTUDIO DEL VPH (EN SEMEN)**

Hubo 3 casos positivos VPH de alto riesgo no 16/18 (1,5 %) uno de ellos en coinfección con *U.urealyticum/parvum* y *M.hominis*. Las parejas de estos casos fueron estudiadas siendo todas ellas negativas para VPH de alto riesgo si bien una de ellas presentó una citología vaginal 13 meses antes con diagnóstico de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL, *Low Squamous Intraepithelial Lesion*) que se normalizó en los controles posteriores a los 5 y 10 meses tras vacunación.

Ninguno de los casos positivos presentó en el análisis del seminograma la prueba MARTest positiva.

En resumen el protocolo de estudio planteado ha sido capaz de detectar microorganismos en 39/205 hombres (19%), siendo de tipo bacteriano en 37 casos (18 %: 33 micoplasmas, 2 clamidias, 2 casos de *Streptococcus grupo viridans* no significativos, estos dos últimos no precisaron tratamiento), y 3 víricas (1,5%: una de ellas en coinfección bacteriana con *U.urealyticum/parvum* y *M.hominis*).

#### 4.11 PRUEBAS DE NORMALIDAD DE LAS VARIABLES OBJETO DE ESTUDIO DEL SEMINOGRAMA. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS PARÁMETROS DEL SEMEN.

La caracterización de la forma y distribución de los datos se analizó mediante los coeficientes de asimetría y curtosis de las variables descritas en la tabla 4.7. La prueba de normalidad de las mismas se detalla en la tabla 4.8.

**Tabla 4.7. Coeficientes de asimetría y curtosis de las variables cuantitativas**

<sup>a</sup> Variable	Prueba de asimetría			Prueba de curtosis		
	Estadístico	Error estándar	Forma	Estadístico	Error estándar	Apuntamiento
Edad hombres (años) (edad <sub>h</sub> )	0,478	0,17	AD	1,088	0,338	L
Vol (mL)	1,065	0,17	AD	1,488	0,338	L
pH	1,271	0,17	AD	2,284	0,338	L
PMN(millones/mL)	2,838	0,365	AD	8,468	0,717	L
Espermatozoides (millones/mL) (esperm)	1,901	0,17	AD	4,070	0,338	L
PR (%)	0,008	0,171	S	-0,37	0,34	P
NPR (%)	-0,363	0,171	AI	-0,598	0,34	P
INM (%)	0,769	0,171	AD	0,543	0,34	L
Morfología normal (%) (morfnor)	6,173	0,172	AD	63,807	0,341	L
REM (millones totales de PR recuperados)	2,686	0,172	AD	10,201	0,341	L
Vitalidad (vit) (% vivos)	-0,016	0,472	S	-1,168	0,918	P

*Abreviaturas:* Vol, volumen de semen; PMN, polimorfonucleares; PR: espermatozoides móviles progresivos; NPR: espermatozoides móviles no progresivos; INM, espermatozoides inmóviles; AD, distribución de los datos Asimétrica por la Derecha; S, distribución de los datos Simétrica; AI, distribución de los datos Asimétrica por la Izquierda; L, distribución Leptocúrtica; M, distribución Mesocúrtica; P, distribución Platocúrtica. <sup>a</sup>Entre paréntesis nombre de la variable y unidades de medida.

**Tabla 4.8. Pruebas de normalidad de las variables cuantitativas**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Z	gl	Sig.	W	gl	Sig.
edad	0,062	<b>205</b>	<b>,052</b>	0,977	205	,002
Vol	0,117	<b>205</b>	,000	0,935	205	,000
pH	0,231	<b>205</b>	,000	0,882	205	,000
<sup>b</sup> PMN	0,335	42	,000	0,548	<b>42</b>	,000
esperm	0,169	<b>205</b>	,000	0,803	205	,000
PR	0,049	<b>203</b>	<b>,200</b>	0,992	203	,365
NPR	0,088	<b>203</b>	,001	0,973	203	,001
INM	0,112	<b>203</b>	,000	0,959	203	,000
morfnor	0,150	<b>201</b>	,000	0,614	201	,000
REM	0,224	<b>201</b>	,000	0,719	201	,000
<sup>b</sup> vit	0,127	24	,200	0,951	<b>24</b>	<b>,281</b>

*Abreviaturas:* como en tabla 4.7. Z, estadístico Z de Kolmogorov-Smirnov; gl, grados de libertad; Sig., Significación asintótica bilateral; W, estadístico W de Shapiro-Wilk.

<sup>a</sup>Corrección de significación de Lilliefors.

<sup>b</sup>Se requiere aplicar prueba de Shapiro-Wilk por evaluarse menos de 50 muestras.

De todas las variables estudiadas, solamente cumplen criterios de normalidad la edad del hombre, el porcentaje de espermatozoides progresivos y la vitalidad espermática, pudiéndoseles aplicar pruebas paramétricas sin necesidad de normalización previa. El resto de las variables deberán ser previamente normalizadas o se les aplicarán pruebas no paramétricas en los estudios de contraste de hipótesis.

El resumen de los parámetros obtenidos del análisis del semen de los participantes en el estudio se describe en la tabla 4.9.



**Tabla 4.9. Resumen de las medias de los parámetros cuantitativos evaluados en el seminograma**

	N / gl	Estadísticos descriptivos	
		*Media/ **Mediana/ ***%	*Error estándar/ **RIQ
Vol	205	**3	**2-4
pH	205	**7,7	**7,5-7,95
<sup>a</sup> Viscosidad aumentada	205	***12,7	*0,023
<sup>b</sup> Presencia agregados	205	***60	*0,034
<sup>c</sup> Presencia aglutinados	205	***2	*0,01
PMN	42	**0,15	**0,1-0,7
<sup>d</sup> MART	205	***1,5	*0,032
esperm	205	**37	**16,5-78
PR	203	*37,16	*1,191
NPR	203	**20	**14-27
INM	203	**39	**32-54
morfnor	201	**8	**4-12
REM	201	**15	**2,9-32,64
vit	24	*51,54	*3,468

*Abreviaturas:* como en tabla 4.7. N, número de observaciones; RIQ, Rango InterQuartílico.

<sup>a</sup>Porcentaje de muestras con viscosidad aumentada.

<sup>b</sup>Porcentaje de muestras con presencia de agregados.

<sup>c</sup>Porcentaje de muestras con presencia de aglutinados.

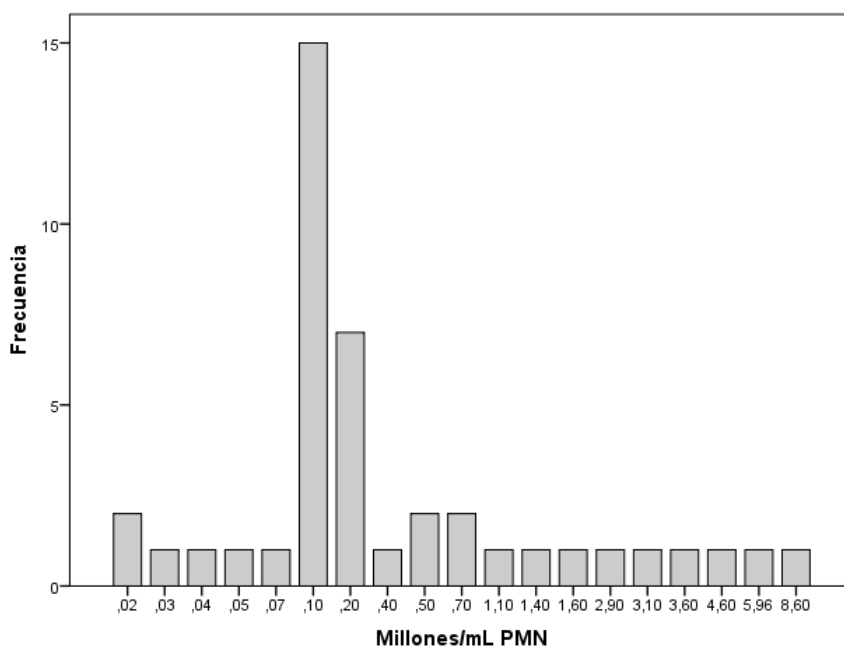
<sup>d</sup>Porcentaje de muestras con test MAR positivo.

Se puede decir que la población estudiada en media, es normozoospermica.

## 4.12 LEUCOCITOS PMN EN SEMEN

### 4.12.1 Evaluación de los pacientes que tienen PMN (42/205)

Se observan PMN en el 20,5% (42/205) de los pacientes, siendo en cantidad < 1 millón/mL en el 16,1% (33/205). La figura 4.6 refleja la cantidad de PMN detectada en las muestras de semen.



**Figura 4.6. Distribución del número de PMN en las muestras de semen**  
Cantidad de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en semen en millones/mL y % de muestras en las que se presentan las distintas cantidades.

En el grupo de pacientes sin PMN en el semen, en el 16,6% (27/163) se detectaron microorganismos en el tracto urogenital (infección/colonización) (17 *U.urealyticum/parvum*; 5 *U.urealyticum/parvum* y *M.hominis*; 1 *M.hominis*; y 1 *C.trachomatis*, 1 *Streptococcus grupo viridans*, 2 VPH). En el grupo de los pacientes con PMN en el semen, el 28,6% (12/42) fueron positivos (6 *U.urealyticum/parvum*; 3 *U.urealyticum/parvum* y *M.hominis*; 1 *U.urealyticum/parvum*, *M.hominis* y VPH; 1 *C.trachomatis*; 1

*Streptococcus grupo viridans*). Todas las frecuencias esperadas fueron mayores de 5. El p-valor de la prueba  $\chi^2(1) = 3,125$  de asociación entre la presencia de microorganismos en el tracto urogenital y la detección de alguna cantidad de PMN es 0,077; esto es, no existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de PMN en el eyaculado y la presencia de microorganismos en el tracto urogenital.

Ahora bien, como muestra la tabla 4.10, los hombres que tienen PMN en el eyaculado tienen 2 (OR: 2,02; IC95%: 0,92 –4,42) veces más riesgo de presencia de microorganismos en el tracto urogenital que los hombres que no tienen PMN en su semen, aunque la asociación no es estadísticamente significativa tras aplicar la prueba Chi-cuadrado de Pearson de asociación.

**Tabla 4.10. Asociación entre la presencia de microorganismos en el tracto urogenital y PMN en el eyaculado**

	NO ITREM (n= 166)	ITREM (n= 39)	P	OR
Presencia de PMN (0,02-8,6 millones/mL)	30 (18,1%)	12 (30,8%)	0,077	2,02 (0,92 - 4,42)

*Abreviaturas:* ITREM, Infección del Tracto Genital Masculino; PMN, Polimorfonucleares; p, p-valor del contraste de hipótesis Chi-cuadrado de Pearson; OR, Odds Ratio.

Análisis intergrupo con prueba de Chi cuadrado de Pearson: significación estadística  $p < 0,05$ .

#### **4.12.2 Presencia de leucocitospermia (> 1 millón/mL de PMN según la WHO 2010) en el semen (SE)**

La presencia de leucocitospermia (> 1 millón/mL de PMN) en el análisis del semen sólo se ha detectado en 9/205 (4,4%) pacientes. De estos 9 casos, sólo en 2 (22,2%) se detectaron microorganismos en el tracto urogenital masculino (*U.urealyticum/parvum*). La frecuencia esperada fue superior a 5 en más del 75% de las asociaciones, siendo la prueba Chi-cuadrado de Pearson de asociación  $\chi^2(1) = 0,062$ ,  $p=0,803$ ; no existiendo una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de leucocitospermia en el eyaculado y la presencia de microorganismos como se muestra en la tabla 4.11, con una OR de 1,23 (0,24-6,15).

**Tabla 4.11. Asociación entre la presencia de microorganismos en el tracto urogenital y leucocitospermia en el eyaculado**

	NO ITREM (n= 166)	ITREM (n= 39)	P	OR
Leucocitospermia (1,1-8,6 millones/mL)	7 (77,8%)	2 (22,2)	0,803	1,23 (0,24 - 6,15)

*Abreviaturas:* como en tabla 4.10.

Leucocitospermia: > 1 millón PMN/mL.

Análisis intergrupo con prueba de Chi cuadrado de Pearson: significación estadística  $p < 0,05$ .

#### **4.13 EVALUACIÓN DE SI EL CONSUMO DE TABACO ES UNA VARIABLE DE INTERACCIÓN EN LOS DATOS OBTENIDOS DEL SEMINOGRAMA.**

##### **4.13.1 Parámetros cuantitativos**

Como se observa en la tabla 4.12, el volumen seminal medio de los 151 hombres no fumadores fue 3,19 mL (DE = 1,48) y el de los 54 fumadores 3,02 mL (DE= 1,18). A la vista del análisis descriptivo, los no fumadores tienen mayor volumen seminal que los fumadores. El análisis de contraste de hipótesis descarta que exista asociación entre el hábito fumador y el volumen seminal (p-valor del contraste de hipótesis U de Mann-Whitney de 0,808).

La misma situación se da para la edad de los hombres fumadores y no fumadores, el pH, el número de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides NPR, con morfología normal, de espermatozoides vivos y del REM.

En cambio, el tabaco sí que es una variable de interacción en relación con el porcentaje de espermatozoides PR que es menor en fumadores, de espermatozoides INM que es mayor en fumadores, y la presencia o no de microorganismos en el tracto urogenital.

La prueba de Levene para igualdad de varianzas, manifestó  $p > 0,05$  en todas las variables con distribución normal estudiadas (edad hombres, PR y vitalidad) por lo que se eligió la p de la prueba t student para igualdad de varianzas como prueba de contraste de hipótesis.

**Tabla 4.12. Asociación entre los parámetros del seminograma cuantitativos y el hecho de ser o no fumador**

	Análisis descriptivo		Contraste hipótesis	Magnitud de la asociación	
	NO FUMADOR (n= 151)	FUMADOR (n= 54)	p (grados de libertad)	Diferencia de medias	IC 95%/ U M-W
Edad hombres (años)	36,14 (4,81)	35,46 (4,16)	0,36 <sup>a</sup> (203)	0,68	-0,78–2,13
Vol (mL)	3,19 (1,48)	3,02 (1,18)	0,808 <sup>b</sup>	0,17	3986
pH	7,76 (0,34)	7,84 (0,39)	0,452 <sup>b</sup>	-0,08	3801,5
Espermatozoides (millones/mL)	60,05 (60,52)	45,31 (48)	0,086 <sup>b</sup>	14,74	3435
PR (%)	38,58 (16,66)	33,06 (17,33)	<b>0,043<sup>a</sup> (201)</b>	5,52	0,18 –10,86
NPR (%)	19,93 (8,11)	19,04 (9,63)	0,648 <sup>b</sup>	0,89	3759,5
INM (%)	41,5 (16,89)	47,9 (19,24)	<b>0,031<sup>b</sup></b>	-6,4	3137,5
	NO FUMADOR (n= 150)	FUMADOR (n= 51)	p (grados de libertad)	Diferencia de medias	IC 95%/ U M-W
Morfología normal (%)	8,65 (8,44)	7,92 (4,62)	0,95 <sup>b</sup>	0,72	3802,5
REM (millones totales de PR recuperados)	29,09 (37,22)	15,93 (18,98)	0,062 <sup>b</sup>	13,16	3155
	NO FUMADOR (n= 14)	FUMADOR (n= 10)	p (grados de libertad)	Diferencia de medias	IC 95%/ U M-W
Vitalidad (% vivos)	52,86 (16,19)	49,7 (18,79)	0,585 <sup>b</sup>	3,16	60

*Abreviaturas:* como en tabla 4.7. p, p-valor del contraste de hipótesis; IC 95%/U M-W, Intervalo de Confianza del 95%/valor del estadístico U de Mann-Whitney.

<sup>a</sup>p-valor del contraste de hipótesis t de Student.

<sup>b</sup>p-valor del contraste de hipótesis U Mann-Whitney.

#### 4.13.2 Viscosidad

Como se observa en la tabla 4.13, de los 20 sémenes viscosos, 8 de ellos correspondían a pacientes fumadores (60%). El p-valor de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el ser fumador y presentar viscosidad seminal aumentada es de 0,144, no encontrándose

asociación estadísticamente significativa, con una  $OR=2,01$  ( $IC_{95\%}$ , 0,78-5,23). El intervalo de confianza al 95% para la OR incluye al 1, indicando, tal y como se ha visto en el contraste de hipótesis, que la viscosidad seminal de los no fumadores puede asumirse igual que la de los fumadores, por lo que el tabaco no es una variable de interacción a la hora de evaluar la asociación entre la viscosidad, y la presencia o no de microorganismos en el tracto urogenital.

#### **4.13.3 Espermatozoides agregados**

De los 122 sémenes con presencia de espermatozoides agregados, 27 pertenecían a pacientes fumadores. El p-valor de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el ser fumador y presentar agregaciones seminales es de 0,097, no encontrándose asociación estadísticamente significativa.

#### **4.13.4 Espermatozoides aglutinados**

Los 4 casos en los que se observó aglutinación espermática correspondieron a pacientes no fumadores. El p-valor de asociación de la prueba exacta de Fisher (el 50% de las casillas presentan menos de 5 valores) entre el ser fumador y presentar aglutinaciones seminales fue de 0,291, no encontrándose asociación estadísticamente significativa, aunque es un número de casos insuficiente para sacar conclusiones estadísticas.

#### **4.13.5 Prueba MARTest**

La influencia del tabaco sobre una positividad del MARTest se consideró no valorable dado que sólo fue positiva en tres pacientes de 194 evaluados (en 11 seminogramas no se pudo evaluar este parámetro por no presentar espermatozoides, o por ser la cantidad muy baja o con poca movilidad).

#### **4.13.6 Alteración de las características de los espermatozoides**

De los 68 hombres con sémenes astenozoospermicos (astenozoospermia, oligoastenozoospermia, astenoteratozoospermia,

oligoastenoteratozoospermia), 23 eran fumadores. El p-valor de la prueba de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el ser fumador y presentar astenozoospermia es de 0,087, no encontrándose asociación estadísticamente significativa.

De los 22 hombres con espermatozoides cuya morfología característica es la elongación de la cabeza (piriforme, delgada, afilada), descrita como frecuente en las infecciones de las glándulas accesorias y el varicocele, sólo 5 eran fumadores. El p-valor de la prueba de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre ser fumador y presentar elongación de la cabeza espermática es de 0,762, no encontrándose asociación estadísticamente significativa.

**Tabla 4.13. Asociación entre los parámetros del seminograma cualitativos y el hecho de ser o no fumador**

	Tabla de contingencia		p	Estimación del riesgo
	NO FUMADOR (n= 151)	FUMADOR (n= 54)		OR (IC95%)
Viscosidad aumentada	12 (60%)	8 (40%)	0,144 <sup>a</sup>	2,01 (0,78 - 5,23)
Presencia de Agregados	95 (77,9%)	27 (22,1%)	0,097 <sup>a</sup>	0,59 (0,32 - 1,1)
Presencia de Aglutinación	4 (100%)	0 (0%)	0,291 <sup>b</sup>	0,73 (0,67 - 0,8)
Astenozoospermia	45 (66,2%)	23 (33,8%)	0,087 <sup>a</sup>	1,75 (0,92 - 3,32)
Cabezas elongadas	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0,392 <sup>a</sup>	0,52 (0,11 - 2,41)

*Abreviaturas:* p, p-valor del contraste de hipótesis; OR, Odds Ratio; IC 95%, Intervalo de Confianza del 95%.

<sup>a</sup>p-valor del contraste de hipótesis Chi-cuadrado de Pearson.

<sup>b</sup>p-valor del contraste de hipótesis prueba exacta de Fisher.

#### **4.14 EVALUACIÓN DE SI EL CONSUMO DE ALCOHOL ES UNA VARIABLE DE INTERACCIÓN EN LOS DATOS OBTENIDOS DEL SEMINOGRAMA.**

En cuanto a la evaluación de si el consumo excesivo de alcohol es una variable de interacción en el estudio y con cualquiera de los parámetros del semen, se decide no realizar los cálculos estadísticos dado que únicamente 2 hombres consumen más de 28 unidades de

alcohol por semana, mientras que los 203 restantes no consumen alcohol o lo hacen en cantidades en las que no está descrito que afecten a la calidad seminal.

#### **4.15 ASOCIACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS DEL SEMEN Y LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN EL TRACTO GENITOURINARIO. VER ANEXO 7**

##### **4.15.1 Parámetros cuantitativos**

Como se observa en la tabla 4.14, el volumen seminal medio de los 166 hombres sin ITREM es de 3,21 mL (DE = 1,42) y el de los 39 hombres con microorganismos en el tracto urogenital es de 2,88 mL (DE= 1,36). A la vista del análisis descriptivo, parece que los no infectados tienen mayor volumen seminal que los infectados. El p-valor del contraste de hipótesis U de Mann-Whitney es de 0,131. Los datos no presentan evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis nula y afirmar que exista una asociación estadísticamente significativa entre si el hombre tiene microorganismos en el tracto urogenital y el volumen seminal; es decir, el volumen seminal medio de los hombres sin microorganismos en el tracto urogenital puede asumirse igual que el volumen seminal medio de los que si presentan microorganismos en el tracto urogenital.



**Tabla 4.14. Asociación entre los parámetros cuantitativos del seminograma y el hecho de tener o no microorganismos en el tracto urogenital**

	Análisis descriptivo		Contraste hipótesis	Magnitud de la asociación	
	NO ITREM (n= 166)	ITREM (n= 39)	p (grados libertad)	Diferencia de medias	IC 95%/U M-W
Edad hombres (años)	35,79 (4,13)	36,69 (6,42)	0,406 <sup>a</sup> (203)	-0,903	-3,1 -1,26
Vol (mL)	3,21 (1,42)	2,88 (1,36)	0,131 <sup>b</sup>	0,33	2733,5
pH	7,77 (0,37)	7,82 (0,32)	0,128 <sup>b</sup>	-0,04	2740,5
Espermatozoides (millones/mL)	58,35 (59,05)	46,85 (51,45)	0,163 <sup>b</sup>	11,5	2771,5
	NO ITREM (n= 164)	ITREM (n= 39)	p (grados libertad)	Diferencia de medias	IC 95%/U M-W
PR (%)	38,39 (16,73)	32 (17,2)	<b>0,034<sup>a</sup> (201)</b>	6,39	0,48 - 12,3
NPR (%)	19,79 (8,38)	19,31 (9,12)	0,831 <sup>b</sup>	1,52	3127,5
INM (%)	41,82 (16,79)	48,69 (20,43)	0,119 <sup>b</sup>	-6,87	2683,5
	NO ITREM (n= 163)	ITREM (n= 38)	p (grados libertad)	Diferencia de medias	IC 95%/U M-W
Morfología normal (%)	8,72 (8,23)	7,34 (4,3)	0,458 <sup>b</sup>	1,38	2858
REM (millones totales de PR recuperados)	27,02 (34,84)	20,28 (29,83)	<b>0,05<sup>b</sup></b>	6,74	2465,5
	NO ITREM (n= 15)	ITREM (n= 9)	p (grados libertad)	Diferencia de medias	IC 95%/U M-W
Vitalidad (% vivos)	49,87 (18,67)	54,33 (14,36)	0,558 <sup>b</sup>	-4,47	57,5

*Abreviaturas:* como en tabla 4.7. p, p-valor del contraste de hipótesis; IC 95%/U M-W, Intervalo de Confianza del 95%/valor del estadístico U de Mann-Whitney.

<sup>a</sup>p-valor del contraste de hipótesis t de Student.

<sup>b</sup>p-valor del contraste de hipótesis U Mann-Whitney.

La misma situación se da para la edad de los hombres con presencia o no de microorganismos en el tracto urogenital, el pH, el número de espermatozoides en millones/mL, el porcentaje de espermatozoides NPR e INM, con morfología normal, y vivos.

En cambio, la presencia o no de microorganismos en el tracto urogenital, se asocia de forma estadísticamente significativa con menor porcentaje de espermatozoides PR y en el límite de la significación estadística con menor REM.

La prueba de Levene para igualdad de varianzas, manifestó  $p > 0,05$  en todas las variables estudiadas por lo que se eligió la  $p$  en la prueba  $t$  student para igualdad de varianzas, excepto para la variable edad del hombre ( $p < 0,001$ ) donde se eligió la  $p$  en la prueba  $t$  student para igualdad de medias con la prueba de Levene para no igualdad de varianzas.

#### **4.15.2 Viscosidad**

Como se observa en la tabla 4.15, de los 20 hombres con sémenes viscosos, 8 de ellos presentaron microorganismos en el tracto urogenital. El  $p$ -valor de asociación Chi-cuadrado de Pearson (los valores esperados en cada celda son iguales o inferiores a 5 en el 25% de las celdas o menos) entre el tener una microorganismos en el tracto urogenital y presentar viscosidad seminal aumentada es de 0,012, encontrándose asociación estadísticamente significativa, con una  $OR=3,3$  ( $IC_{95\%}$ , 1,25-8,77). El intervalo de confianza al 95% para la  $OR$  no incluye al 1, indicando, tal y como se ha visto en el contraste de hipótesis, que el riesgo de presentar viscosidad seminal aumentada en los hombres con microorganismos en el tracto urogenital se multiplica por 3,3 frente a aquellos que no los presentan.

**Tabla 4.15. Asociación entre los parámetros cualitativos del seminograma y la presencia de microorganismos en el tracto urogenital**

	Tabla de contingencia		Estimación del riesgo	
	NO ITREM (n= 166)	ITREM (n= 39)	p	OR (IC95%)
Viscosidad aumentada	12 (60%)	8 (40%)	<b>0,012<sup>a</sup></b>	3,3 (1,25 - 8,77)
Presencia de Agregados	101 (80,8%)	21 (17,2%)	0,423 <sup>a</sup>	0,75 (0,37 - 1,52)
Presencia de Aglutinación	3 (75%)	1 (25%)	0,573 <sup>b</sup>	1,43 (0,14 - 14,13)
Astenozoospermia	52 (76,5%)	16 (23,5%)	0,247 <sup>a</sup>	1,52 (0,74 - 3,12)
Elongación de la cabeza (piriforme, delgada, afilada), microcefalia, acrosoma anormal o presencia de gota citoplasmática	33 (54,1%)	28 (45,9%)	<b>0,0001<sup>a</sup></b>	11,03 (4,87 - 24,97)
Elongación de la cabeza (piriforme, delgada, afilada)	12 (54,5%)	10 (45,5%)	<b>0,001<sup>a</sup></b>	4,494 (1,771-11,40)
Microcefalia	3 (30%)	7 (70%)	<b>0,0001<sup>a</sup></b>	12,04 (2,95-49,14)
Gota citoplasmática	1 (5,3%)	18 (94,7%)	<b>0,0001<sup>a</sup></b>	145,8 (18,46-1151,47)
Acrosoma anormal	13 (81,3%)	3 (18,8%)	0,987 <sup>a</sup>	0,99 (0,27-3,66)

*Abreviaturas:* p-valor del contraste de hipótesis; OR (IC 95%), Odds Ratio (Intervalo de Confianza del 95%).

<sup>a</sup>p-valor del contraste de hipótesis Chi-cuadrado de Pearson.

<sup>b</sup>p-valor del contraste de hipótesis prueba exacta de Fisher.

### 4.15.3 Espermatozoides agregados

De los 122 hombres con sémenes con presencia de espermatozoides agregados, 21 de ellos presentaron microorganismos en el tracto urogenital. El p-valor de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el tener microorganismos en el tracto urogenital y

presentar agregados seminales es de 0,42, no encontrándose asociación estadísticamente significativa.

#### **4.15.4 Espermatozoides aglutinados**

Sólo hubo un caso con presencia de microorganismos en el tracto urogenital entre los 4 hombres en los que se detectaron espermatozoides aglutinados. El p-valor de asociación de la prueba exacta de Fisher (el 50% de las casillas presentan menos de 5 valores) entre el tener microorganismos en el tracto urogenital y presentar aglutinaciones seminales fue 0,573, no encontrándose asociación estadísticamente significativa, aunque es un número de casos insuficiente para sacar conclusiones estadísticas.

#### **4.15.5 MARTest**

La presencia de microorganismos en el tracto urogenital en relación con MARTest positivo no es valorable dado que sólo se observaron 3 casos positivos entre los 194 analizados (en 11 seminogramas no se pudo evaluar este parámetro por no presentar espermatozoides, o por ser la cantidad muy baja o con poca movilidad). Ahora bien, ninguno de los casos positivos presentó positividad para ninguno de los microorganismos estudiados.

De los 3 casos con MARTest positivo, uno presenta astenozoospermia idiopática (PR: 7%) y esterilidad tubárica, y los otros dos normozoospermia pero con un % de PR en el límite de la normalidad (36 y 38%) con fallo ovárico oculto y esterilidad de origen desconocido en la mujer, respectivamente.

#### **4.15.6 Alteración de las características de los espermatozoides**

De los 68 hombres con sémenes astenozoospermicos (astenozoospermia, oligoastenozoospermia, astenoteratozoospermia, oligoastenoteratozoospermia), 16 presentaban microorganismos en el tracto urogenital. El p-valor de la prueba de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el tener microorganismos en el tracto urogenital y

presentar astenozoospermia es de 0,231, no encontrándose asociación estadísticamente significativa.

De los 61 hombres con espermatozoides cuya morfología característica es la elongación de la cabeza (piriforme, delgada, afilada), microcefalia, acrosoma anormal o presencia de gota citoplasmática (descritas todas ellas como frecuentes en las infecciones del TREM), 28 presentaban microorganismos en el tracto urogenital. El p-valor de la prueba de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el tener microorganismos en el tracto urogenital y presentar elongación de la cabeza espermática, microcefalia, acrosoma anormal o presencia de gota citoplasmática, es de  $p < 0,0001$ , encontrándose asociación estadísticamente significativa, con una OR de 11,03 (4,873-24,966).

De los 22 hombres con espermatozoides cuya morfología característica es la elongación de la cabeza (piriforme, delgada, afilada), 10 presentaban microorganismos en el tracto urogenital. El p-valor de la prueba de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el tener microorganismos en el tracto urogenital y presentar elongación de la cabeza espermática, es de  $p < 0,001$ , encontrándose asociación estadísticamente significativa, con una OR de 4,494 (1,771-11,402).

De los 10 hombres con espermatozoides cuya morfología característica es la microcefalia, 7 presentaban microorganismos en el tracto urogenital. El p-valor de la prueba de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el tener microorganismos en el tracto urogenital y presentar microcefalia, es de  $p < 0,0001$ , encontrándose asociación estadísticamente significativa, con una OR de 12,043 (2,952-49,137).

De los 19 hombres con espermatozoides cuya morfología característica es la presencia de residuo citoplasmático 18 presentaban microorganismos en el tracto urogenital. El p-valor de la prueba de asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el tener microorganismos en el tracto urogenital y presentar presencia de residuo citoplasmático, es de  $p < 0,0001$ , encontrándose asociación estadísticamente significativa, con una OR de 145,800 (18,461-1151,468).

De los 16 hombres con espermatozoides cuya morfología característica es presentar acrosoma anormal, 3 presentaban microorganismos en el tracto urogenital. El p-valor de la prueba de

asociación Chi-cuadrado de Pearson entre el tener microorganismos en el tracto urogenital y presentar acrosoma anormal, es de  $p=0,987$ , no encontrándose asociación estadísticamente significativa.

#### 4.16 EVALUAR SI LA ESTERILIDAD TUBÁRICA CORRELACIONA CON LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN EL TRACTO GENITOURINARIO MASCULINO.

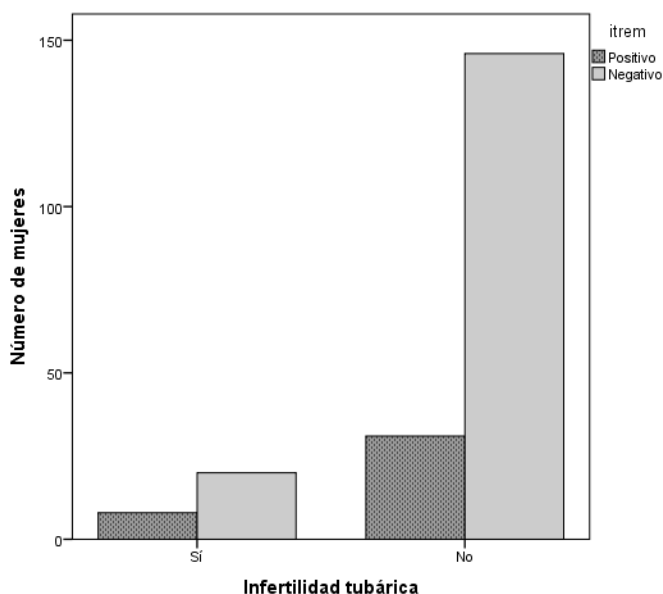
De las 28 mujeres con factor de esterilidad tubárico puro (20) o asociado a otros factores de esterilidad (8), 8 de sus parejas presentaron microorganismos en el tracto urogenital. El p-valor de la prueba  $\chi^2$  de asociación entre el tener una ITREM y presentar esterilidad tubárica la pareja femenina es de 0,166, no encontrándose asociación estadísticamente significativa, con una OR=1,88 (IC95%, 0,76-4,67). Ver tabla 4.16 y figura 4.7.

**Tabla 4.16. Asociación entre la esterilidad tubárica y el hecho de tener o no una ITREM**

	Tabla de contingencia		Estimación del riesgo	
	NO ITREM (n= 166)	ITREM (n= 39)	p	OR (IC95%)
Esterilidad tubárica	20 (71,4%)	8 (28,6%)	0,166 <sup>a</sup>	1,88 (0,76 - 4,67)

*Abreviaturas:* p-valor del contraste de hipótesis; OR (IC 95%), Odds Ratio (Intervalo de Confianza del 95%).

<sup>a</sup>p-valor del contraste de hipótesis Chi-cuadrado de Pearson.



**Figura 4.7. Esterilidad tubárica y positividad de ITREM**

Presencia de infección del tracto reproductor masculino (itrem) y parejas femeninas que presentan infertilidad tubárica.

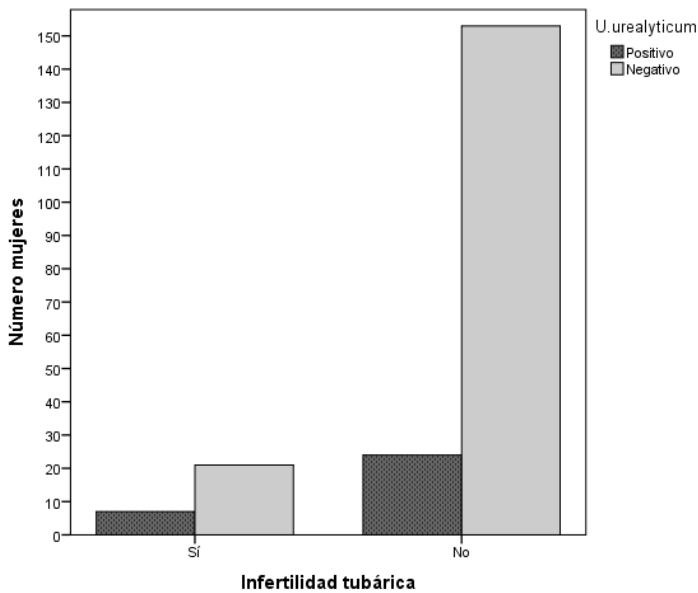
El estudio de esterilidad tubárica frente a infección por *U.urealyticum/parvum* en el varón, tampoco mostró asociación estadísticamente significativa ( $p=0,116$ ) pero el diagnóstico de este microorganismo en el varón multiplicó por 2 (OR=2,125, IC: 0,82-5,54) la probabilidad de que la pareja presentara obstrucción de las trompas uterinas (7/28), diferencia sin significación estadística ( $p>0,05$ ). Ver tabla 4.17 y Ver figura 4.8.

**Tabla 4.17. Asociación entre la esterilidad tubárica y presencia o no de *U.urealyticum***

	Tabla de contingencia		Estimación del riesgo	
	NO <i>Uu</i> (n= 166)	<i>Uu</i> (n= 39)	p	OR (IC95%)
Esterilidad tubárica	21 (74%)	7 (25%)	0,116	2,12 (0,82 - 5,54)

Abreviaturas: *Uu*, *U.urealyticum*; p-valor del contraste de hipótesis; OR (IC 95%), Odds Ratio (Intervalo de Confianza del 95%).

<sup>a</sup>p-valor del contraste de hipótesis Chi-cuadrado de Pearson.



**Figura 4.8. Esterilidad tubárica y detección de *U.urealyticum*/parvum en la pareja**  
Presencia de infección del tracto reproductor masculino por *U.urealyticum*/parvum y parejas femeninas que presentan infertilidad tubárica.

Si se analiza la esterilidad tubárica frente a la infección por *C.trachomatis* en el varón, tampoco se encuentra asociación estadísticamente significativa ( $p=0,572$ ), no presentando esterilidad tubárica ninguna de las dos parejas femeninas de los dos casos positivos para *C.trachomatis*, pero en este caso el OR=1,01 (IC95%, 1-1,03). Ver tabla 4.18.

**Tabla 4.18. Asociación entre la esterilidad tubárica y presencia o no de *C.trachomatis***

	Tabla de contingencia		Estimación del riesgo	
	NO Ct (n= 166)	Ct (n= 39)	p	OR (IC95%)
Esterilidad tubárica	28 (100%)	0 (0%)	0,572 (1)	1,01 (1 - 1,03)

Abreviaturas: Ct, *C.trachomatis*; p-valor del contraste de hipótesis; OR (IC 95%), Odds Ratio (Intervalo de Confianza del 95%).  
<sup>a</sup>p-valor del contraste de hipótesis Chi-cuadrado de Pearson.



#### **4.17 RELACIÓN ENTRE VARIABLES CON SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA Y LAS VARIABLES CONSUMO DE TABACO E ITREM EN LOS HOMBRES**

Mediante regresión lineal múltiple se analizó si las variables predictoras independientes consumo de tabaco e itrem, están asociadas a la variable cuantitativa continua PR e INM. Estas últimas se eligieron en función de los análisis univariante realizados previamente que demostraron significación estadística.

Con anterioridad a la aplicación del modelo de regresión lineal múltiple se comprobó que los residuos (diferencia entre los valores observados y los predichos por el modelo) cumplían:

- \* Independencia de los residuos, o sea no existencia de correlación entre los residuos. Para ello se utilizó el estadístico de Durbin y Watson (0-4), no existiendo correlación si el valor del estadístico es próximo a 2.
- \* Criterio de homocedasticidad: los residuos deben ser iguales para todos los valores predichos por la variable dependiente. En caso de no cumplirse, se realizó transformación de la variable dependiente o independiente.
- \* Distribución normal de los residuos: es un criterio importante pero no necesario. Si no tienen una distribución normal se puede hacer una transformación de la variable dependiente o ejecutar el análisis y asumir el error.
- \* Existencia de una relación lineal entre cada una de las variables independientes por separado con la variable dependiente. Se comprobó mediante un gráfico de dispersión y en caso de no existir relación se puede hacer una transformación de la variable dependiente o independiente.
- \* Multicolinealidad: se da cuando existen dos o más variables independientes que están correlacionadas entre sí, o sea, dos o más variables aportan la misma información, por lo que si ocurre no podemos saber que variable contribuye realmente en los resultados del modelo.

Se aplicó el contraste de hipótesis ANOVA para determinar la existencia de diferencias en la media de las variables cuantitativas PR e INM en los grupos definidos por las variables de exposición tabh

(hombres que fuman) e itrem (presencia de microorganismos en el tracto urogenital) con 2 categorías. Para ello, se confirmaron las distribuciones normales de las variables estudiadas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (tenemos más de 50 casos) (Tabla 4.19).

**Tabla 4.19. Pruebas de normalidad de las variables cuantitativas PR e INM**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Z	gl	Sig.	W	gl	Sig.
PR	,049	<b>203</b>	<b>,200</b>	,992	203	,365
INM	,112	<b>203</b>	,000	,959	203	,000

*Abreviaturas:* como en tabla 4.7. Z, estadístico Z de Kolmogorov-Smirnov; gl, grados de libertad; Sig., Significación asintótica bilateral; W, estadístico W de Shapiro-Wilk.

<sup>a</sup>Corrección de significación de Lilliefors.

Dado que la variable PR la  $p > 0,05$  (0,2) fue normal, se aplicó directamente el análisis de la varianza (ANOVA). En el caso de la variable INM hubo de realizarse una normalización previa.

Además, debe constatar que la desviación estándar poblacional de la variable cuantitativa de interés debe ser la misma en los diferentes grupos definidos por la variable de exposición (prueba homogeneidad varianzas).

#### **4.17.1 Regresión lineal simple PR vs tabh**

El p-valor del estadístico F (4,16) del contraste de hipótesis ANOVA es  $< 0.05$  (0,043). Los datos presentan evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis nula y afirmar que existe una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de tabaco por los hombres del estudio (tabh) y el porcentaje de espermatozoides progresivos (PR); la media de PR varía en función de si se fuma o no.

El p-valor de la prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene) fue 0,647 por lo que puede asumirse que la varianza de PR es la misma en las dos categorías de tabh.

La magnitud de esta asociación se cuantificó mediante regresión lineal simple calculando la disminución (IC 95%) en la variable de

interés PR por cada aumento de una unidad en la variable de exposición tabh (tabaco), disminuyendo el porcentaje de PR en 5,5 unidades (tabla 4.20).

**Tabla 4.20. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable dependiente PR y la independiente tabh**

	B	Error estándar	Sig.
(Constante)	38,576	1,370	,000
tabh	-5,518	2,707	,043

*Abreviaturas:* B, coeficiente de regresión; Sig., nivel de significación bilateral; tabh, consumo de tabaco o no de cada uno de los participantes hombres.

Variable dependiente: PR.

Predictores: (Constante), tabh.

La recta de asociación de ambas variables sería:

$$PR = 38,58 - 5,5 \text{ tabh}$$

#### **4.17.2 Regresión lineal simple PR vs. itrem**

El p-valor del estadístico F del contraste de hipótesis ANOVA es <0.05 (0,034). Los datos presentan evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis nula y afirmar que existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de infección en los hombres del estudio (itrem) y el porcentaje de espermatozoides progresivos (PR); la media de PR varía en función de si tienen infección o no.

El p-valor de la prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene) es 0,539. Los datos son compatibles con la asunción de que, en la población de la que se extrajo la muestra, la varianza de PR es la misma en las dos categorías de itrem.

Se realizó la cuantificación de la magnitud de la asociación mediante el cálculo del incremento (IC95%) en la variable de interés PR por cada aumento de una unidad en la variable de exposición itrem (presencia de infección), mediante regresión lineal simple, el porcentaje de PR disminuye 6,39 (tabla 4.21).

**Tabla 4.21. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable dependiente PR y la independiente itrem**

	B	Error estándar	Sig.
(Constante)	38,390	1,313	,000
itrem	-6,390	2,996	,034

*Abreviaturas:* B, coeficiente de regresión; Sig., nivel de significación bilateral; itrem, infección del tracto reproductor masculino.

Variable dependiente: PR.

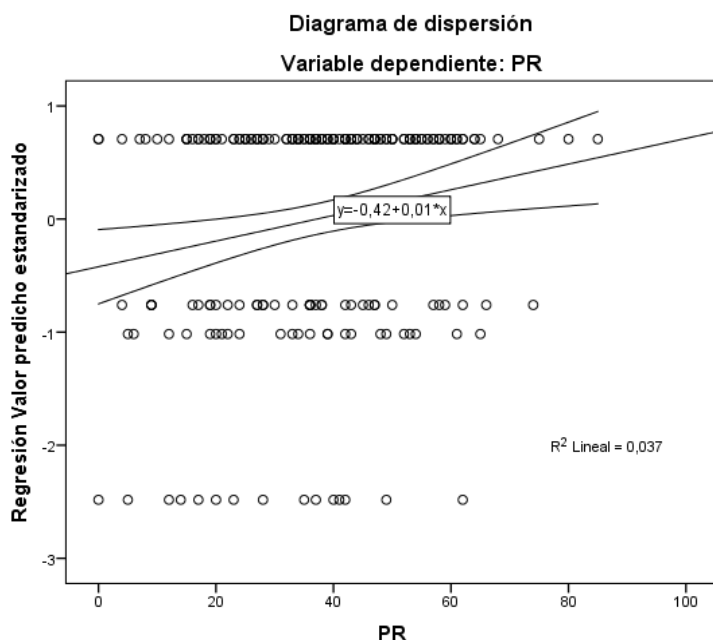
Predictores: (Constante), itrem.

La recta de asociación de ambas variables es:

$$PR = 38,39 - 6,39 \text{ itrem}$$

#### **4.17.3 Regresión lineal múltiple PR vs tabh + itrem**

En el análisis lineal multivariante para predecir el efecto sobre el porcentaje de espermatozoides progresivos, se incluyeron el tabaco y la presencia de ITREM. Ambas se encuentran en el límite de la significación estadística (tabh  $p < 0,08$ , itrem  $p < 0,063$ ),  $F(2,200) = 3,85$ ,  $p < 0,023$ . Las dos variables, de forma conjunta, explican el 3,7% ( $R^2 = 0,037$ ) de la variabilidad observada en la variable dependiente PR, por lo que la intensidad de ajuste de correlación del modelo es baja como se puede observar en la figura 4.9.



**Figura 4.9.** Diagrama de dispersión que representa los valores exactos frente a los predichos por el modelo PR vs tabh + itrem representando la bondad de ajuste del mismo.

*Abreviaturas:* PR, porcentaje de espermatozoides progresivos; tabh, hombres fumadores; itrem, hombres con infección del tracto reproductor masculino.

Los coeficientes de regresión y los errores estándar se presentan en la tabla 4.22.

**Tabla 4.22.** Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal múltiple de la variable dependiente PR y las independientes tabh e itrem

	B	Error estándar	Beta	Sig.
(Constante)	39,471	1,443		,000
tabh	-4,789	2,718	-,124	,080
itrem	-5,629	3,012	-,131	,063

*Abreviaturas:* B, coeficiente de regresión; Beta, coeficiente de regresión estandarizado, Sig., nivel de significación bilateral; tabh, consumo de tabaco o no de cada uno de los participantes hombres; itrem, infección del tracto reproductor masculino. Variable dependiente: PR. Predictores: (Constante), tabh, itrem. Beta indica la importancia de cada variable predictora independiente dentro de la ecuación de regresión.

La recta de asociación de las variables es:

$$PR = 39,471 - 4,789 \text{ tabh} - 5,629 \text{ itrem}$$

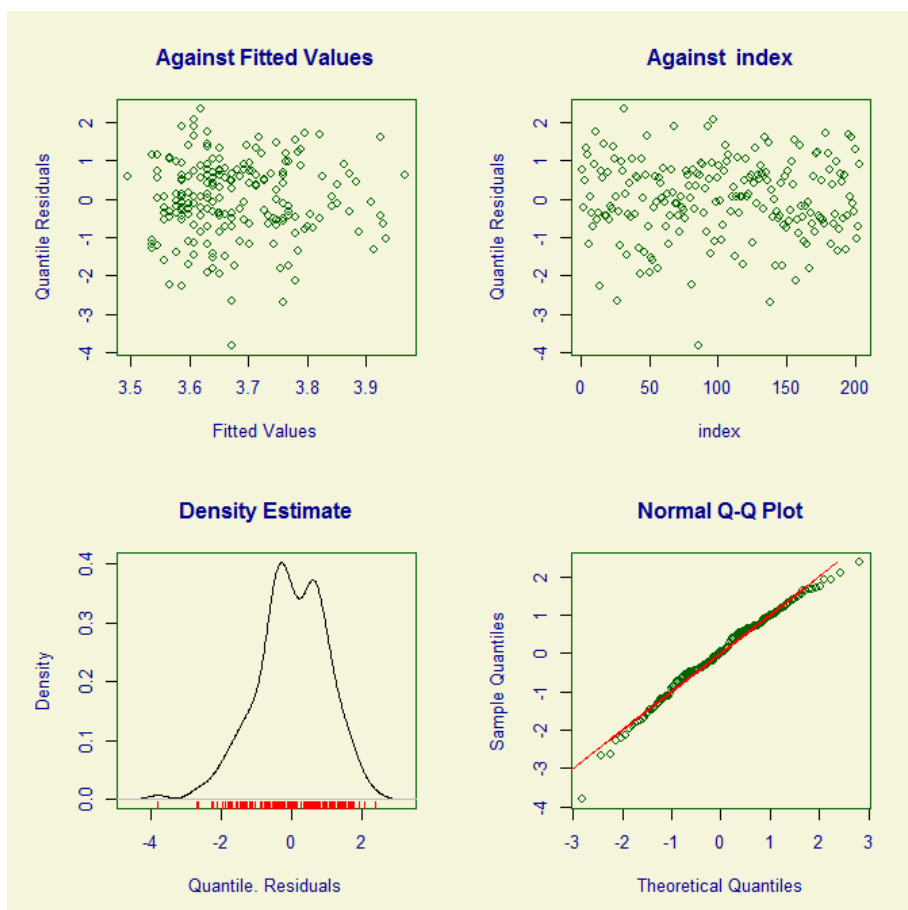
De acuerdo con estos datos, la variable que más efecto tuvo sobre el porcentaje de espermatozoides progresivos fue itrem (Beta=0,131), seguida de tabh (Beta=0,124). Por otro lado, la relación entre el porcentaje PR y la presencia de ITREM así como el ser fumador fue negativa, por lo que ambas variables se asociaron a la disminución de los valores de espermatozoides progresivos.

El mayor efecto en la predicción del porcentaje de espermatozoides progresivos se constató para la variable itrem con un 13,1% y la variable tabh (12,4%).

#### **4.17.4 Regresión lineal simple lnINM vs tabh**

Los hombres fumadores presentaron porcentajes de espermatozoides inmóviles (Mdn=42,5) superiores a los pacientes no fumadores (Mdn=38),  $U=3137$ ,  $z=-2,159$ ,  $p<0,05$ .

Dado que la variable INM no es normal, se estudió cuál es la mejor transformación (estimación curvilínea). Para ello se ordenó de forma ascendente la variable INM y luego se realizó la búsqueda de la mejor transformación. Se eligió la transformación exponencial ( $R^2=0,931$ ) (ver figura 4.10).



**Figura 4.10. Variable INM tras transformación exponencial para normalizar la misma.**

Imagen obtenida con el software R-Comander paquete Gamless.

Tras la transformación se realiza la prueba de ANOVA y la cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable  $\ln\text{INM}$ .

El p-valor del estadístico F del contraste de hipótesis ANOVA fue  $<0.05$  (0,033). De acuerdo con los cálculos se rechazó la hipótesis nula aceptándose una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de tabaco (tabh) y el  $\ln$  porcentaje de espermatozoides inmóviles ( $\ln\text{INM}$ ).

El p-valor de la prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene) fue 0,932. Los datos son compatibles con la asunción de que, en la población de la que se extrajo la muestra, la varianza de lnINM es la misma en las dos categorías de tabh.

La cuantificación de la magnitud de la asociación mediante el cálculo del incremento (IC95%) en la variable de interés lnINM por cada aumento de una unidad en la variable de exposición tabh (fumador), mediante regresión lineal simple, mostró un aumento del porcentaje de INM del 6,02 (tabla 4.23).

**Tabla 4.23. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable dependiente lnINM y la independiente tabh**

	B	Error estándar	Sig.
(Constante)	3,640	,035	,000
tabh	,147	,068	,033

*Abreviaturas:* B, coeficiente de regresión; Sig., nivel de significación bilateral; tabh, consumo de tabaco o no de cada uno de los participantes hombres.

Variable dependiente: lnINM.

Predictores: (Constante), tabh.

La recta de asociación de ambas variables es:

$$\ln INM = 3,64 + 0,147 \text{ tabh} \text{ ó}$$

$$INM = e^{**}(3,64 + 0,147 \text{ tabh}) = e^{**}(3,64) \times e^{**}(0,147 \text{ tabh})$$

$$= 38,09 \times 1,158 \text{ tabh} = 44,11 \text{ tabh}$$

#### 4.17.5 Regresión lineal simple lnINM vs itrem

En el grupo de pacientes con ITREM, los porcentajes de espermatozoides inmóviles (Mdn=42) fueron similares a los del grupo de no infectados (Mdn=38),  $U=2683,5$ ,  $z=-1,561$ ,  $p=0,119$ .

Tras transformar la variable INM se realizó la prueba de ANOVA y cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable lnINM.

El p-valor del estadístico F del contraste de hipótesis ANOVA calculado fue  $<0.05$  (0,041). La evidencia estadística mostrada por estos datos fue suficiente para rechazar la hipótesis nula y afirmar que



existe una asociación estadísticamente significativa entre itrem y el ln porcentaje de espermatozoides inmóviles (lnINM); la media de INM varía en función de si existe ITREM o no.

El p-valor de la prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene) obtenido fue 0,852. Los datos son compatibles con la asunción de que, en la población de la que se extrajo la muestra, la varianza de lnINM es la misma en las dos categorías de tabh.

Se realizó la cuantificación de la magnitud de la asociación mediante el cálculo del incremento (IC95%) en la variable de interés lnINM por cada aumento de una unidad en la variable de exposición itrem (infección), mediante regresión lineal simple, que mostró un aumento del porcentaje de INM de 6,49 (tabla 4.24).

**Tabla 4.24. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal de la variable dependiente lnINM y la independiente itrem**

	B	Error estándar	Sig.
(Constante)	3,648	,033	,000
Itrem	,156	,076	,041

*Abreviaturas:* B, coeficiente de regresión; Sig., nivel de significación bilateral; itrem, infección del tracto reproductor masculino.

*Variable dependiente:* lnINM.

*Predictores:* (Constante), itrem.

La recta de asociación de ambas variables es:

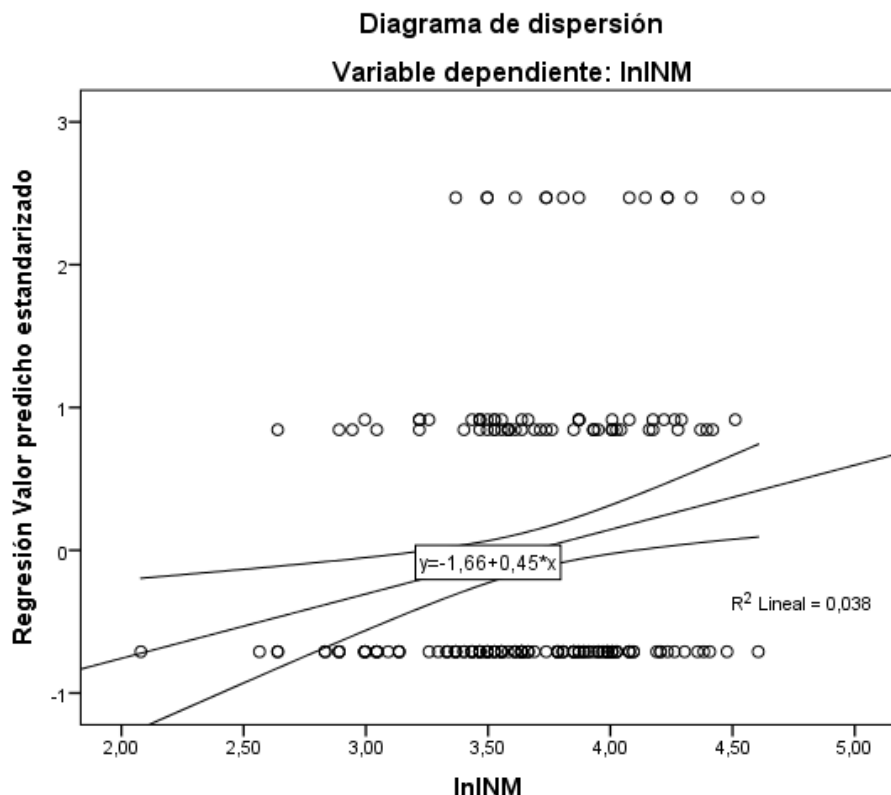
$$\ln INM = 3,648 + 0,156 \text{ itrem} \text{ ó}$$

$$INM = e^{**}(3,648 + 0,156 \text{ itrem}) = e^{**}(3,648) \times e^{**}(0,156 \text{ tabh}) \\ = 38,4 \times 1,169 \text{ tabh} = 44,89 \text{ tabh}$$

#### 4.17.6 Regresión lineal múltiple lnINM vs tabh + itrem

En el análisis lineal multivariante para predecir si afectan al porcentaje de espermatozoides inmóviles, se incluyeron el tabaco y la presencia o no de itrem. Ambas variables se encuentran en el límite de la significación estadística (tabh  $p < 0,061$ , itrem  $p < 0,077$ ) para predecir que afectan al porcentaje de INM,  $F(2,200) = 3,905$ ,  $p < 0,022$ . Las dos variables en conjunto consiguen explicar el 3,8% ( $R^2 =$

0,038) de la variabilidad observada en la variable dependiente INM, por lo que la intensidad de ajuste de correlación del modelo es baja como se puede observar en la figura 4.11.



**Figura 4.11.** Diagrama de dispersión que representa los valores exactos frente a los predichos por el modelo lnINM vs tabh + itrem representando la bondad de ajuste del mismo.

*Abreviaturas:* INM, porcentaje de espermatozoides inmóviles; tabh, hombres fumadores; itrem, hombres con infección del tracto reproductor masculino.

Los coeficientes de regresión y los errores estándar se presentan en la tabla 4.25.

**Tabla 4.25. Cuantificación de la asociación mediante regresión lineal múltiple de la variable dependiente lnINM y las independientes tabh e itrem**

	B	Error estándar	Beta	Sig.
(Constante)	3,619	,037		,000
tabh	,130	,069	,132	,061
itrem	,135	,076	,124	,077

*Abreviaturas:* B, coeficiente de regresión; Beta, coeficiente de regresión estandarizado, Sig., nivel de significación bilateral; tabh, consumo de tabaco o no de cada uno de los participantes hombres; itrem, infección del tracto reproductor masculino.

Variable dependiente: lnINM.

Predictores: (Constante), tabh, itrem.

Beta indica la importancia de cada variable predictora independiente dentro de la ecuación de regresión.

La recta de asociación de las variables es:

$$\ln INM = 3,619 + 0,130 \text{ tabh} + 0,135 \text{ itrem} \text{ ó}$$

$$INM = e^{**}(3,619 + 0,130 \text{ tabh} + 0,135 \text{ itrem})$$

$$= e^{**}(3,619) \times e^{**}(0,130 \text{ tabh}) \times e^{**}(0,135 \text{ itrem})$$

$$= 37,3 \times 1,139 \text{ tabh} \times 1,144 \text{ itrem} = 48,6 \text{ tabh/itrem}$$

Se realizó la cuantificación de la magnitud de la asociación mediante el cálculo del incremento (IC95%) en la variable de interés lnINM por cada aumento de una unidad en las variable de exposición tabh e itrem (fumador e infección), mediante regresión lineal múltiple, el porcentaje de INM aumenta en conjunto un 11,3% (tabla 4.27).

Resumiendo, la variable que más efecto demostró sobre el porcentaje de espermatozoides inmóviles fue tabh (Beta=0,132), seguida de itrem (Beta=0,124). La relación entre el porcentaje INM e itrem así como tabh fue positiva, es decir, que la infección y/o el ser fumador aumentan los valores de la variable respuesta (espermatozoides inmóviles). El mayor efecto en la predicción del porcentaje de espermatozoides inmóviles fue el asociado a la variable tabh con un 13,2%, seguido de la variable ITREM con un 12,4%.

#### 4.18 RESULTADOS DEL CUESTIONARIO NIH-CPSI

Se evaluó su potencial capacidad para sustituir el cribado de prostatitis (protocolo Meares y Stamey) o el cribado microbiológico de ITREM (protocolo Meares y Stamey + PCR).

##### 4.18.1 Uso del cuestionario NIH-CPSI para predecir prostatitis

El cuestionario Índice de Síntomas de Prostatitis consiste en 9 preguntas agrupadas en dolor (1-4), síntomas urinarios (5-6), y efecto sobre la calidad de vida (7-9). La tabla 4.26 describe las medias de cada pregunta así como las medias de las distintas puntuaciones suma de dolor, síntomas, dolor y síntomas, calidad de vida y la puntuación de la suma total de puntuación de las distintas preguntas (nihcpsi, scoreto).

Tabla 4.26. Puntuación promedio de los distintos ítems del cuestionario NIH-CPSI

Item (puntos)	Media $\pm$ desviación estándar
dolorloc (0-6, pregunta 1 y 2)	0,24 $\pm$ 0,043
dolorfre (0-5, pregunta 3)	0,23 $\pm$ 0,046
dolorsev (0-10, pregunta 4)	0,40 $\pm$ 0,088
<sup>a</sup> dolor (0-21: 6+5+10)	0,88 $\pm$ 0,162
<sup>b</sup> scoredolor (leve: 0-7; moderado: 8-13; severo: 14-21)	leve
sinturi (0-10, pregunta 5 y 6)	1,01 $\pm$ 0,118
<sup>c</sup> dolorsin (0-31: 6+5+10+10)	1,89 $\pm$ 0,208
<sup>d</sup> scoredosin (leve: 0-9; moderado: 10-18; severo 19-31)	leve
calsint (0-6, pregunta 7 y 8)	0,24 $\pm$ 0,055
calvida (0-6, pregunta 9)	0,85 $\pm$ 0,108
<sup>e</sup> efcalvida (0-12)	1,1 $\pm$ 0,148
<sup>f</sup> nihcpsito (0-43)	2,99 $\pm$ 0,337
<sup>g</sup> scoreto (poco probable: 0-3; Probable: 4-7; Muy probable: 8-43)	poco probable

*Abreviaturas:* dolorloc, localización del dolor; dolorfre, frecuencia del dolor; dolorsev, severidad del dolor; sinturi, síntomas urinarios; calsint, efecto de los síntomas sobre la calidad de vida; calvida, efecto general sobre la calidad de vida.

<sup>a</sup>dolor: suma de la puntuación de localización, frecuencia y severidad del dolor.

<sup>b</sup>scoredolor: agrupación de la puntuación de dolor en tres categorías de severidad.

<sup>c</sup>dolorsin: suma de la puntuación de dolor y síntomas urinarios.

<sup>d</sup>scoredosin: agrupación de la puntuación del dolor y síntomas urinarios en tres categorías de severidad.

<sup>e</sup>efcalvida: suma de la puntuación de efectos sobre la calidad de vida.

<sup>f</sup>nihcpsito: puntuación total del cuestionario NIH-CPSI.

<sup>g</sup>scoreto: agrupación de la puntuación total del cuestionario NIH-CPSI en tres categorías de severidad.

En la tabla 4.27 se describe el número de hombres catalogados por el cuestionario como poco probable, probable o muy probable que tuvieran prostatitis (una de las posibilidades de ITREM).

**Tabla 4.27. Puntuación suma total de las distintas preguntas del cuestionario NIH-CPSI (scoreto)**

Puntuación total	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Poco probable	145	70,7	70,7
Probable	27	13,2	83,9
Muy probable	33	16,1	100,0
Total	205	100,0	

*Abreviaturas:* scoreto, agrupación de la puntuación total del cuestionario NIH-CPSI en tres categorías de severidad.

Según el cuestionario, el 29,3% (60) de los hombres es probable o muy probable que tengan una prostatitis que, sin embargo, no tuvo confirmación microbiológica (ningún caso de prostatitis mediante el estudio microbiológico).

#### **4.18.2 Uso del cuestionario NIH-CPSI para predecir ITREM**

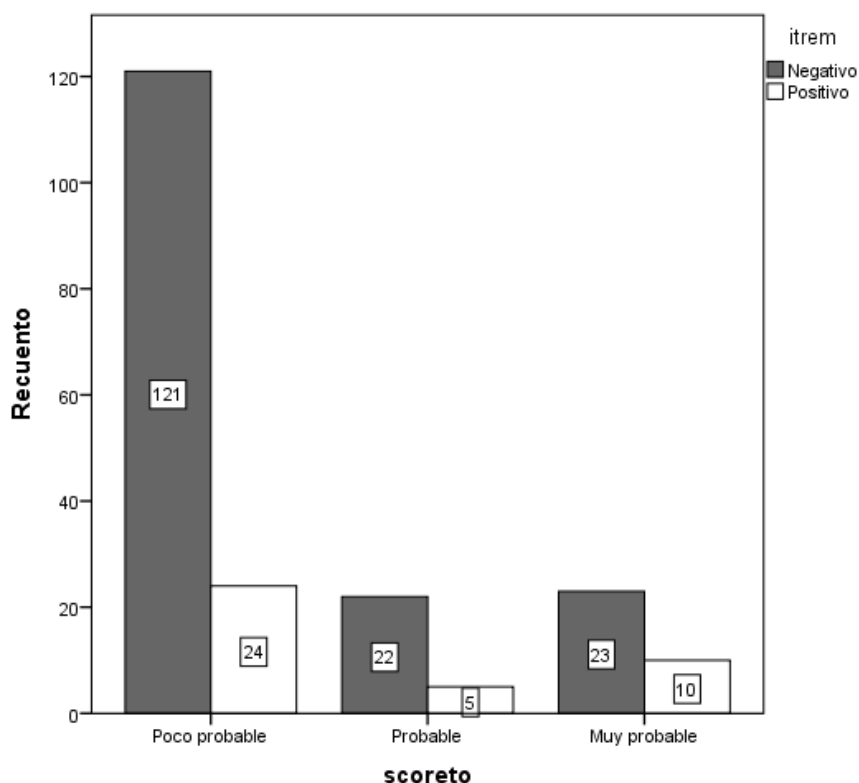
Con el fin de valorar la utilidad del cuestionario en la detección de pacientes con colonización/ITREM y su potencial capacidad para sustituir el cribado microbiológico se analizó la asociación entre la puntuación total y el resultado microbiológico. Como se observa en la tabla 4.28, el porcentaje (o prevalencia) de hombres con itrem es del

16,6% entre los que tienen poca probabilidad de tener prostatitis según el cuestionario; 18,5% en los catalogados como probables de tener prostatitis; y 30,3% en aquellos con mucha probabilidad de tenerla. El análisis descriptivo indica a mayor probabilidad de prostatitis, mayor porcentaje de hombres con ITREM. Sin embargo, el p-valor de asociación Chi-cuadrado de Pearson (los valores esperados en cada celda son iguales o inferiores a 5 en el 25% de las celdas o menos) entre la probabilidad de prostatitis evaluada por el cuestionario y la detección de ITREM por el protocolo propuesto en el estudio es de 0,192, por lo que no existe asociación estadísticamente significativa (ver figura 4.12).

**Tabla 4.28. Tabla de contingencia scoreto\*itrem**

			itrem		
			Negativo	Positivo	Total
scoreto	Poco probable	Recuento	121	24	145
		% dentro de scoreto	83,4%	16,6%	100,0%
	Probable	Recuento	22	5	27
		% dentro de scoreto	81,5%	18,5%	100,0%
	Muy probable	Recuento	23	10	33
		% dentro de scoreto	69,7%	30,3%	100,0%
Total	Recuento	166	39	205	
	% dentro de scoreto	81,0%	19,0%	100,0%	

*Abreviaturas:* scoreto, suma total de puntos del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis recodificado en tres categorías en función de la probabilidad de tener una prostatitis (Poco probable: 0-3 puntos; Probable: 4-7 puntos; Muy probable: 8-43 puntos); itrem, infección del tracto reproductor masculino.



**Figura 4.12. Diagrama de asociación scoreto\*itrem**

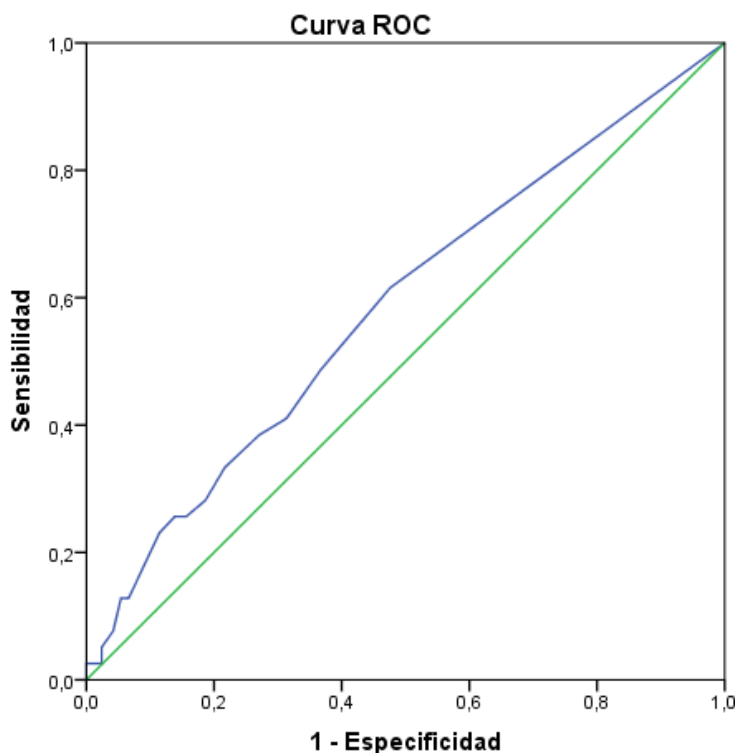
Hombres que presentan infección del tracto reproductor masculino (itrem) frente a la suma total de puntos del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (scoreto) recodificado en tres categorías en función de la probabilidad de tener una prostatitis (Poco probable: 0-3 puntos; Probable: 4-7 puntos; Muy probable: 8-43 puntos).

Por otro lado se construyó la curva ROC (figura 4.13) para evaluar la capacidad de discriminar entre los pacientes con ITREM de los que no por parte del cuestionario NIH-CPSI como prueba diagnóstica hipotética.

Dado que el área bajo la curva es de 0,585 (IC: 0,483-0,686);  $p < 0,1$ , próximo a 0,5, indica que el cuestionario no sirve para discriminar entre pacientes con ITREM de los no infectados, además el intervalo de confianza incluye el valor de no discriminación (0,5). De hecho, el punto de corte óptimo es de 1, con una sensibilidad del

61% y especificidad del 52%, lo cual quiere decir que sumando un único punto de 43 posibles en el cuestionario se obtiene el mayor poder discriminatorio del mismo, lo cual implica que a la más mínima molestia en el tracto reproductor masculino o al orinar, se debería evaluar la presencia de ITREM.

En el caso de que se decidiera no realizar el estudio de ITREM a aquellos pacientes cuyo cuestionario sumará cero puntos, o sea que no tuvieran ningún tipo de dolor o molestia al orinar, tal como describe la tabla 4.29, habrían quedado fuera 102 pacientes de los que 15 fueron positivos en el cribado microbiológico (14,7%). En aquellos en que el sumatorio del cuestionario es  $\geq 1$  punto la prevalencia sería del 23,3% (24/103).



**Figura 4.13 Curva ROC nihcpsito\*itrem**

*Abreviaturas:* nihcpsito\*itrem, capacidad de discriminar entre los pacientes con ITREM de los que no, por parte del cuestionario NIH-CPSI como prueba diagnóstica hipotética.



Tabla 4.29. Tabla nihcpsito\*itrem tabulación cruzada

	Recuento	itrem		Total
		Negativo	Positivo	
nihcpsito	0	87	15	102
		85,3%	14,7%	100,0%
1		18	5	23
		78,3%	21,7%	100,0%
2		9	3	12
		75,0%	25,0%	100,0%
3		7	1	8
		87,5%	12,5%	100,0%
4		9	2	11
		81,8%	18,2%	100,0%
5		5	2	7
		71,4%	28,6%	100,0%
6		5	1	6
		83,3%	16,7%	100,0%
7		3	0	3
		100,0%	0,0%	100,0%
8		4	1	5
		80,0%	20,0%	100,0%
9		6	3	9
		66,7%	33,3%	100,0%
10		2	1	3
		66,7%	33,3%	100,0%
11		2	0	2
		100,0%	0,0%	100,0%
12		1	1	2
		50,0%	50,0%	100,0%
13		1	1	2
		50,0%	50,0%	100,0%
14		3	1	4
		75,0%	25,0%	100,0%
16		0	1	1
		0,0%	100,0%	100,0%
17		1	0	1
		100,0%	0,0%	100,0%
21		2	0	2
		100,0%	0,0%	100,0%
24		1	0	1
		100,0%	0,0%	100,0%
27		0	1	1
		0,0%	100,0%	100,0%
Total		166	39	205
		81,0%	19,0%	100,0%

*Abreviaturas:* nihcpsito, variable suma total de puntos del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis; nihcpsito\*itrem, capacidad de discriminar entre los pacientes con ITREM de los que no por parte del cuestionario NIH-CPSI como prueba diagnóstica hipotética.



## 5 DISCUSIÓN

Hasta la fecha, los estudios publicados discrepan en cuanto a la relevancia de efectuar análisis microbiológicos de forma sistemática en el estudio del varón estéril para descartar colonización/ITREM, al protocolo de estudio más adecuado, y a los criterios diagnósticos que atribuyan patogenicidad a la presencia de los microorganismos encontrados. Además no existe consenso en cuanto a la conveniencia de su erradicación o el tratamiento más adecuado. Por otro lado, la eficacia real sobre los indicadores de fertilidad de la detección y tratamiento de la colonización/ITREM en la pareja estéril se convierte en un dilema ético dado que, conociendo la existencia de un microorganismo, podría no ser aceptable plantear un estudio donde unos pacientes sean tratados y otros no, de forma randomizada. Así pues, sigue sin demostrarse el papel patógeno de algunos de los microorganismos hallados en el tracto urogenital masculino, su contribución de forma significativa a la esterilidad masculina y, en definitiva, el interés de su detección y tratamiento erradicador. Es por ello que se diseñó un estudio descriptivo que permitiera resolver algunas de estas cuestiones con el fin de intentar mejorar los resultados de los tratamientos de reproducción asistida.

### 5.1 POBLACIÓN A ESTUDIO

#### 5.1.1 Tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral del estudio se asumió una prevalencia de infección basada en prostatitis del 8,2% (Krieger y *col.*, 2008; Clemens y *col.*, 2005a,b; Yoon y *col.* 2012). Ahora bien, asumiendo un error tipo  $\beta$  del 4,00% en la estimación de una proporción mediante un intervalo de confianza asintótico normal al 95,00% bilateral, con la prevalencia real de infección/colonización

encontrada en la población a estudio del 16,1% para alguno de los micoplasmas estudiados, realmente hubiera sido necesario incluir a 324 individuos en el estudio. Además, se tuvo un porcentaje de abandonos del 10,09% (no del 5,00% como se había estimado), por lo que hubiera sido necesario reclutar 361 individuos, mayor a los reclutados, lo cual probablemente le hubiera dado más peso estadístico a alguno de los datos encontrados, como la asociación de PMN e ITREM ( $p=0,077$ ) o leucospermia e ITREM ( $p=0,062$ ), de ITREM y REM ( $p=0,05$ ), o de infertilidad tubárica e ITREM ( $p=0,116$ ).

Dado que en un principio el estudio se fundamentaba en la búsqueda de prostatitis, se asumieron los cálculos en función de los datos publicados para la misma dado que no se disponía de datos en la población a estudio. Tras el análisis de los datos obtenidos se comprobó que la prevalencia de la prostatitis en la población a estudio fue nula probablemente porque no es una población de riesgo. Además se utilizó el dato de prevalencia de prostatitis por la utilización del cuestionario NHI-CPSI. Ahora bien, dado los resultados obtenidos, para posteriores estudios se recomienda utilizar el dato de prevalencia de colonización/infección de la uretra.

### **5.1.2 Muestras a estudiar**

Meares y Stamey (1968) demostraron que los cultivos bacteriológicos cuantitativos del fluido prostático localizan claramente el agente etiológico cuando son confrontados con el cultivo de los 10 ml de la orina de la primera porción (O1), la porción media (O2) y la orina post masaje prostático (O3). Este método es considerado de referencia para la localización de la infección en la glándula prostática, a pesar de lo incómodo que puede resultar para el paciente.

Ahora bien, la técnica de Meares y Stamey actualmente es poco utilizada por su complejidad, falta de resultados fiables y por requerir repetición en algunos casos, reservándose para cuando se tienen dudas etiológicas de la infección o cuando hay una mala respuesta al tratamiento.

En el planteamiento del estudio se descartó la utilización de la secreción prostática obtenida en frasco estéril mediante masaje prostático transrectal para examen bacteriológico en busca de la

identificación de microorganismos procedentes de la próstata, dado que:

A. En caso de prostatitis aguda está contraindicado practicar masaje prostático, porque es doloroso y puede originar un episodio de bacteriemia (Aus y *col.*, 1996).

B. El urocultivo está justificado dado que el 80% de las ITREM proceden en su origen de la vía urinaria.

C. En la prostatitis bacteriana crónica, se requiere realizar cultivo bacteriológico cuantitativo y el examen microscópico de la orina de la porción media (O2), y de la secreción prostática (SP), con arreglo a lo descrito por Meares y Stamey (1968). Es en este caso en el que sustituimos la secreción prostática por el semen, teniendo en cuenta que aunque la muestra seminal no proviene exclusivamente de la próstata, el interés en las muestras para las TRHA será detectar la infección y tratarla, más que diferenciar entre una prostatitis, uretritis, epididimitis u orquitis.

D. La dificultad de recolección de la SP post-masaje prostático, al precisar recoger la muestra de SP en consulta y disponer de urólogo/andrólogo para la realización del masaje prostático. Esto se simplifica con la recolección del eyaculado.

E. Igualmente, no se recoge flujo/frotis uretral por la necesidad de disponer de la misma forma de un urólogo para su toma, sustituyéndose por la orina O1.

F. Mobley (1975) demostró la utilidad del cultivo de semen en el diagnóstico de la infección prostática y estableció que la correlación entre cultivo de SP y cultivo de semen es excelente cuando la orina es estéril.

H. La sensibilidad de la SP para detectar inflamación es la misma que la del eyaculado, y comparable al análisis de O3 (28% frente al 29% respectivamente). Por otro lado, la combinación del análisis de la SP en combinación con O3 (orina vesical con restos de las secreciones prostáticas en uretra tras masaje prostático), detecta el mismo número de casos de procesos inflamatorios (74%) que la combinación del análisis del eyaculado en combinación con O3 (74%), mejorando en ambos casos la sensibilidad la incorporación de O3 (Krieger y *col.*, 2002). Ahora bien, lo ideal sería la combinación de la SP y el eyaculado, con una sensibilidad del 95%.

I. Punab y *col.* en el 2003, demostraron que la carga microbiológica de las muestras de semen en individuos del grupo IIIa y IV de prostatitis, son muy similares a las obtenidas en el cultivo de la SP.

J. Al centrar el estudio en individuos estériles, la OMS sugiere que deben cumplirse dos de los siguientes criterios para diagnosticar una ITREM en hombres con oligo, asteno o teratozoospermia:

a. Historia de signos físicos de infección del tracto urinario, epididimitis o tacto rectal anormal.

b. O3 anormal tras masaje prostático tras realizar la prueba de las 4 muestras de Meares y Stamey.

c. Número elevado de leucocitos peroxidasa positivo, elevado número de bacterias en semen, hallazgos de *C.trachomatis*, parámetros bioquímicos en plasma seminal alterados, o marcadores inflamatorios elevados en fluido seminal.

Así, la OMS no recomienda el análisis de la SP. Además esta clasificación de la OMS no diferencia entre prostatitis, epididimitis y alteraciones inflamatorias de la uretra (uretritis crónica) (Weidner y *col.*, 2008a,b).

### 5.1.3 Interpretación de los resultados

Los hallazgos microbiológicos y su correlación con los datos clínicos son difíciles de establecer, en particular cuando no se aplican técnicas cuantitativas para la detección de patógenos oportunistas.

La gran diversidad de agentes microbiológicos y las dificultades para su detección que supone un considerable consumo de tiempo, de personal, y de técnicas analíticas, no permite realizar un análisis rutinario de todos los agentes implicados en las ITREM en los pacientes enrolados en los programas de TRHA.

En el protocolo propuesto en este estudio, la contaminación de la muestra de semen con microbiota de la uretra y de la piel, se minimizó con el lavado y desinfección de las manos y genitales antes de la recolección, y orinando previamente (O1 y O2). No podemos proceder a la desinfección de la uretra pero si podemos comparar la microbiota de la primera muestra de orina (O1, que representa la colonización de la uretra) y la del semen. Punab (2003, datos no publicados) encontraron sólo microbiota similar en la primera orina y en el semen en el 37% de

las muestras, siendo el número mucho menor en la orina, por lo que muchos de los microorganismos detectados en el semen no provienen de la uretra pero pueden indicar infección del TREM superior.

Ahora bien, en el caso de los individuos que se van a someter junto con su pareja a una TRHA, se deben hacer esfuerzos para que el diagnóstico alcance más allá de los estudios rutinarios, dado el esfuerzo psíquico, físico y económico que suponen estos procedimientos.

La recogida rigurosamente aséptica y el protocolo de cultivo descrito anteriormente facilitan la interpretación de los resultados eliminando la contaminación de microorganismos cutáneos, de las vías urinarias y de la uretra. Gracias a una información rigurosa de cómo realizar la toma de la muestra y con individuos verdaderamente comprometidos en realizar una recogida aséptica, se obtienen resultados de hasta un 80% de cultivos negativos (Askienazy-Elbhar, 2005), evitando así un antibiograma y un posterior tratamiento inútil que lo único que puede llegar a generar son resistencias a los antibióticos. En la URHA-CHUS, antes de la realización de una TRHA, se realizó el protocolo de estudio propuesto y antibiograma de forma sistemática tras aplicar los criterios de positividad descritos en la tabla 3.4. A diferencia del estudio de Askienazy-Elbhar, en el presente trabajo no hubo ningún diagnóstico de prostatitis de acuerdo con los criterios de Meares y Stamey. Las características de las poblaciones reclutadas así como la metodología utilizada podrían explicar los distintos resultados.

El cribado de ITREM durante el estudio previo a TRHA, no solo es importante desde el punto de vista de la salud masculina y/o diagnóstico de posibles causas de esterilidad, sino también del éxito del tratamiento. En el caso de practicar una IIU con espermatozoides que transporten microorganismos unidos al flagelo (*Proteus*) o que incluso atraviesan la membrana citoplasmática del gameto masculino (*Chlamydia*, *Ureaplasma*), puede causar infección de vías altas, endometritis, o salpingitis en la pareja. Igualmente puede ocurrir una infección pelviana tras una punción ovárica o bien tras una transferencia embrionaria. Por otro lado, si se realiza una FIV, el medio de cultivo se podría contaminar tras la inseminación de los

óvulos con espermatozoides que porten microorganismos lo que supondría la finalización del tratamiento sin poder transferir embriones al útero con las consecuencias emocionales y económicas que ello supondría. Dado que los datos existentes en la literatura científica son pocos, debemos ser muy cautos a la hora de confirmar que el gameto masculino es estéril, incluso tras su lavado y selección. Askienazy-Elbhar (2005) describe la presencia de bacterias en el 50% de sémenes que van a ser utilizados para TRHA antes de su selección espermática y, en títulos de 100 a 1000 UFC/mL en el 10% de los preparados espermáticos de los mismos ya listos para ser usados tras utilizar la técnica de gradientes de densidad. Esta técnica tiene como objetivo eliminar microorganismos, leucocitos y restos celulares. La falta de eficacia en la eliminación de la contaminación microbiana previa al uso de los espermatozoides plantea la conveniencia de tratamiento antibiótico en la pareja femenina en el caso de no realizar estudios microbiológicos del semen pre TRHA.

En el estudio de ITREM previo a TRHA, el cultivo debe hacerse con la suficiente antelación con el fin de iniciar el tratamiento antibiótico en caso necesario y dejar tiempo suficiente para su eliminación evitando su posible toxicidad sobre la fertilidad masculina (Schlegel y *col.*, 1991), aunque no demasiado tiempo para evitar una reinfección. Es recomendable hacer un control de la eficacia del tratamiento pasadas 3-4 semanas de la finalización del tratamiento.

Se estima que aproximadamente un 15% de los casos de esterilidad masculina están asociados a infecciones agudas o crónicas del tracto genital masculino (Pellati y *col.*, 2008). La bacteriospermia puede estar presente en cuadros fisiopatológicos diferentes: contaminación, bacteriospermia no patógena, o bacteriospermia patógena descubierta en el estudio de las ITREM previo a un ciclo de FIV. Por ello, la interpretación correcta de los resultados de un cultivo de semen precisa de condiciones preanalíticas rigurosas, y se hace en función de la concentración del o de los microorganismos encontrados, de la leucospermia asociada o no, de la clínica (factores favorecedores como la diabetes, sondas vesicales en lesionados medulares, malformaciones urogenitales, consumo de tóxicos como el tabaco, tratamientos antibióticos recientes), del seminograma que



puede reflejar determinadas alteraciones espermáticas, de la asociación eventual de una infección cervicovaginal de la pareja y de la TRHA a realizar.

En algunos países europeos como Francia legislan la realización de un cultivo de semen y la búsqueda de ADN de *C.trachomatis* por PCR en el estudio de la pareja estéril por Decreto (Orden de 3 de agosto de 2010 del Diario Oficial del Gobierno Francés, JORF) y recomiendan la realización de un cultivo de semen antes de realizar TRHA. Así, aconsejan que el estudio sea de menos de 6 meses, en caso de realizar inseminación intrauterina, y de menos de 1 año para el resto de TRHA. En los casos positivos se precisará confirmar su negativización tras el tratamiento.

En España, el REAL DECRETO 1301/2006, de 10 de noviembre, *por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos*, se expresa la obligación de control microbiológico en los cultivos celulares para uso autólogo pero no hace mención expresa al semen, aunque si dice que *"los donantes de esperma deben tener marcadores negativos para Chlamydia trachomatis en una muestra de orina y por determinación mediante PCR"*.

## **5.2 PREVALENCIA EN LA POBLACIÓN A ESTUDIO DE LOS DISTINTOS MICROORGANISMOS DETECTADOS**

### **5.2.1 Estudio microbiológico de prostatitis**

Como ya se comentó previamente, el objetivo de los cultivos de semen previos a TRHA es detectar posibles infecciones ocultas en el TREM que cursen de forma asintomática o subclínica y que puedan estar relacionadas con la esterilidad del paciente pudiendo, incluso, revertir esta situación con un tratamiento adecuado (Zeyad y col., 2017; Domes y col., 2012) además de evitar su transmisión a la mujer durante los procedimientos de TRHA. Alternativamente, algunos autores proponen el tratamiento empírico previo con doxiciclina 100 mg/12

horas durante 2-3 semanas, más diclofenaco en dosis de 50 mg/12 horas durante 4-6 semanas como antiinflamatorio y captador de radical hidroxilo (Aruoma y Halliwell, 1988, Gallegos y col., 2008). No obstante, esta práctica conduce al uso, en muchos casos innecesario, de antibióticos con los efectos negativos que esto conlleva en relación con la posibilidad de emergencia de resistencias a los mismos, así como la alteración de la microbiota normal del tracto urogenital.

A diferencia de lo publicado por otros autores (Dolivo y col., 1993; Askienazy-Elbhar, 2005), en este estudio no se diagnosticó ningún caso de prostatitis atendiendo a los resultados de los análisis microbiológicos. Sin embargo, su bajo coste (menos de 5 euros/paciente) y los potenciales beneficios, nos hacen considerar, coincidiendo con la opinión de otros autores (Abdel Monem y col., 2013) que el cribado de prostatitis debería mantenerse como parte del estudio en los pacientes incluidos en TRHA. No obstante, debe recordarse que, aunque pueda eliminarse la contaminación uretral, el origen exacto de los microorganismos en el semen es difícil de determinar dadas las diferentes fuentes de los componentes del fluido seminal. Sí que es cierto que la baja prevalencia de infección seminal (ningún caso) junto con el hecho de que la tinción de gram es menos sensible que el cultivo, nos hace proponer la eliminación de la observación microscópica del protocolo de estudio microbiológico.

## **5.2.2 Micoplasmas en O1 y tratamiento**

### **5.2.2.1 Cribado de micoplasmas en O1**

El interés del cribado de micoplasmas genitales en el tracto urogenital masculino se centra en cuatro aspectos fundamentales. En primer lugar, la ausencia de estos microorganismos en el semen se asocia a una mejor calidad del mismo en términos de fertilidad ya que se ha demostrado su relación con alteraciones de la morfología y movilidad de los espermatozoides así como el aumento de la fragmentación de su ADN (Upadhyaya y col., 1984; Naessens y col., 1986; Zeighami y col., 2009, Gdoura y col., 2007; Rose y col., 1994; Núñez-Calonge y col., 1998, Rodríguez y col., 2001, Zhang y col., 2014; Sellami y col., 2014; Qian y col., 2016; Zhou y col., 2017, Kim y col.,

2017; Zeyad y col., 2017; Hannachi y col., 2018; Wan y col.; 2018). También se ha podido observar como su presencia se asocia a menores tasas de éxito en la fecundación (Montagut y col., 1991, Li y col., ASRM abstracts, 2016). Se han publicado estudios en pacientes infectados/colonizados con micoplasmas genitales en los que se constata que el grupo tratado con antibióticos dirigidos presenta mayores tasas de fecundación que el de los no tratados (Swenson y col. 1979, Toth y col., 1983; Montagut y col., 1991; Wittemer y col., 2004,). En tercer lugar, hay evidencia suficiente sobre los efectos adversos que tiene la colonización del tracto genital femenino sobre la gestación. Así, estos microorganismos se asocian a corioamnionitis, rotura prematura de membranas, parto prematuro o placentación previa (Montagut y col. 1991; Kanakas y col., 1991; Shalika y col., 1996; Wittemer y col., 2004; Gdoura y col., 2008; Aydogan y col., 2014; Sweeney y col., 2016a,b). Además, también pueden producir infección del feto, sepsis neonatal e infección postparto en la madre (Kafetzis y col. 2004, Olomu y col., 2009). En último término, la ausencia de micoplasmas en el semen usado para fecundar permitirá en muchos casos, emplear técnicas convencionales en lugar de ICSI facilitando y reduciendo el coste del procedimiento (Navarro y col., 2006).

Una limitación importante para conseguir la esterilidad completa del semen de micoplasmas es la eficacia limitada de los procedimientos de lavado y preparación (Knox y col., 2003) que, por otro lado no pueden detectarse macroscópicamente debido a que no desarrollan turbidez en los medios de cultivo. Por consiguiente, el cribado y tratamiento de los hombres que participan en los programas de reproducción asistida puede contribuir a la mejora de los resultados y el abaratamiento de los procedimientos. Para decidir sobre esta cuestión de una forma razonable, debe conocerse la prevalencia de infección/colonización por micoplasmas genitales en esta población, así como la eficacia de los tratamientos antibióticos dirigidos.

La prevalencia estimada para todos los micoplasmas genitales en el estudio fue del 16% (15,1 % *Ureaplasma spp*; 3,9 % *M.hominis*, prácticamente todos ellos en coinfección con *Ureaplasma spp.*, 2,9%; y 0% *M.genitalium*). Existen numerosos estudios sobre prevalencia de este grupo de microorganismos en muestras urogenitales tanto de

hombres como de mujeres, en los que la variabilidad de los resultados informada es muy elevada (Khosropour y *col.*, 2015, Horner y *col.*, 2016, Choi y *col.*, 2018, Zhou y *col.*, 2018, Kasprzykowska y *col.*, 2018, Horner y *col.*, 2018). Ello se justifica, no solo por la diversidad geográfica, a la que también se apunta (Seifoleslami y *col.*, 2015), sino también, a la metodológica (detección por cultivo convencional, mediante galerías comerciales, por técnicas moleculares caseras o comerciales). Teniendo en cuenta los datos aportados en estos estudios, los resultados obtenidos en la presente serie son similares a muchos de ellos en los que también se detecta una mayor prevalencia de *Ureaplasma spp* sobre *M.hominis* (Andrade-Rocha y *col.*, 2001; Daxboeck y *col.*, 2005; Horner, 2018; Kasprzykowska y *col.*, 2018), con tasas de hasta el 5% de *M.genitalium* (Gdoura y *col.*, 2007). Cabe destacar la ausencia de *M.genitalium* en nuestra población en relación con otras series publicadas (Andrade-Rocha y *col.*, 2001; Asenjo y *col.*, 2018). Esto puede deberse a que los hábitos sexuales del grupo estudiado en este trabajo son, probablemente, más conservadores ya que se trata de parejas estables, a la búsqueda de hijos y, con una mediana de edad de 36 años. De hecho, se ha observado una disminución de la colonización/infección por *M.hominis* con la edad (Pignanelli y *col.*, 2015).

Además la detección mediante diagnóstico serológico de las infecciones en la mujer causadas *M.hominis*, *Ureaplasma spp.* y *M.genitalium* hoy en día se debería realizar mediante técnicas moleculares en orina, muestras vaginales o endocervicales, abandonando la serología. La propiedad que tienen de colonizar habitualmente las mucosas del tracto urogenital dificulta la interpretación de los títulos de anticuerpos por lo que su mera presencia no se considera significativa. Además, ninguna de las técnicas serológicas empleadas proporciona resultados satisfactorios en el diagnóstico de estas infecciones genitales (Acosta-Boga y *col.*, 2011).

Las tasas de fracaso terapéutico frente a *Ureaplasma spp.* encontradas en este estudio sorprenden por su elevado valor particularmente en relación con azitromicina. La revisión de la bibliografía respecto a las tasas de resistencia para estos microorganismos nos ofrece un panorama de alta variabilidad que, de

forma similar a la descrita en el caso de la prevalencia puede justificarse por diferencias geográficas pero, especialmente por la diversidad de metodologías empleadas para la realización del antibiograma (Beeton y col., 2015; Beeton y col., 2017). Dado que los micoplasmas son microorganismos de crecimiento “fastidioso” es habitual que los estudios de resistencia no se realicen de rutina o se hagan usando galerías comerciales no estandarizadas en sus inóculos y concentraciones de antibióticos. Por otro lado, las guías CLSI tampoco aportan normas para el ensayo y la interpretación de algunos antibióticos habitualmente utilizados en los tratamientos. Así pues, es complicado extraer conclusiones, pero, aun teniendo en cuenta los datos más elevados de resistencias para azitromicina publicados (39%) (Huang y col., 2016), el porcentaje de fracasos encontrado en este estudio estaría muy por encima (100%). Ello nos lleva a considerar otras posibles razones. En algunos estudios se ha constatado la persistencia de los micoplasmas en las vías genitales después de tratamientos exitosos. Así, en pacientes con uretritis, a pesar de la resolución de los síntomas tras un tratamiento correcto, en muchos pacientes sigue detectándose la presencia de estos microorganismos (Khosropour y col., 2015). Algunos estudios argumentan que la pauta de azitromicina en monodosis (1 g/1 día) no es eficaz además de poder contribuir al desarrollo de resistencias recomendando, en su lugar, una dosis de carga de 500 mg seguida de 4-5 días de tratamiento con 250 mg/día (Skerk y col., 2001.). Por otro lado, el hecho de que tanto azitromicina como doxiciclina sean antibióticos bacteriostáticos y deben actuar en una localización de pH ácido como es el tracto urogenital puede ser otra razón a favor de la dificultad para conseguir la completa descolonización (Khosropour y col., 2015). La posibilidad de que el fracaso sea debido a la transmisión recíproca entre la pareja debe desecharse en este trabajo ya que el tratamiento se aplicó a ambos miembros de la misma a los que se les advirtió sobre la conveniencia de usar preservativo hasta su finalización.

En lo que respecta a *M.hominis*, también se detecta un porcentaje de fracasos terapéuticos algo superior al de las resistencias comunicadas frente a doxiciclina que podría justificarse, al igual que

en el caso de *Ureaplasma* por el carácter bacteriostático del antibiótico y su actuación en pH bajos.

En ambos microorganismos y con respecto a las quinolonas, no podemos sacar conclusiones definitivas dado el bajo número de casos del estudio. No obstante, en algunas publicaciones se informan resistencias frente a levofloxacin del 40% (Redelinghuys y col., 2014) similares a las obtenidas en este trabajo.

A la hora de debatir sobre la conveniencia de cribado y tratamiento de los pacientes inmersos en los programas de reproducción asistida y, teniendo en cuenta estos datos de prevalencia deben de tenerse en cuenta cuatro aspectos relacionados con la colonización/infección del tracto urogenital por micoplasmas:

*a) Como potenciales patógenos causantes de enfermedad urogenital*

Este es un aspecto controvertido. Hay abundante bibliografía considerando su papel exclusivamente saprófito ya que las prevalencias encontradas en poblaciones sintomáticas y asintomáticas son similares (Bachmann y col., 2015; Marovt y col., 2015). También hay autores que admiten su papel etiológico en la uretritis pero consideran que el porcentaje de casos es bajo y no justifica un cribado sistemático; solo la búsqueda una vez descartados otros patógenos más habituales (Horner y col., 2018). Por último, hay también un número elevado de trabajos que demuestran estadísticamente la asociación entre uretritis y micoplasmas (Zhang y col., 2014; Cox y col., 2016). La posibilidad de realizar determinaciones moleculares (PCR en tiempo real) que cuantifiquen la carga bacteriana ha puesto de manifiesto que es la cantidad de micoplasma y no su presencia/ausencia el factor asociado a la presencia de síntomas (Yoshida y col., 2007; Shimada y col., 2014; Liu y col., 2014; Deguchi y col., 2015).

*b) Como causantes de mala calidad del semen y esterilidad*

El papel del *U.urealyticum* en la esterilidad masculina ha sido ampliamente discutido. Las ITREM por el germen pueden ser sintomáticas o asintomáticas. “In vitro” se ha demostrado que ataca a

los espermatozoides reduciendo la movilidad y provocando alteraciones en la membrana espermática (Núñez-Calonge y col., 1998). “In vivo”, no se ha demostrado que afecte a los parámetros seminales clásicos ni que la terapia antibiótica mejore los mismos. Ahora bien, en el contexto de la FIV puede afectar al embrión y consecuentemente a su implantación dado que altera la cromatina espermática repercutiendo en el desarrollo embrionario (Reichart y col., 2000). Estos autores especulan que la degradación del DNA espermático provocada por el *Ureaplasma*, libera metabolitos que favorecen el metabolismo energético tanto de los espermatozoides como de los propios *Ureaplasmas* y consecuentemente mejoran la motilidad espermática y por otro lado este mecanismo podría ser el que facilite la invasividad del *Ureaplasma in vivo*.

Se ha demostrado que *M.genitalium* puede adherirse a los espermatozoides y así ser trasladado al tracto genital femenino (Svenstrup y col., 2003).

Se ha observado un incremento en la calidad del semen y mejores resultados de las TRHA en parejas infectadas por micoplasmas que habían sido previamente tratadas con antibióticos específicos para erradicar la infección (Toth y col., 1973; Swenson y col., 1979). De hecho, se ha demostrado que cuando se usa semen infectado con *Ureaplasma spp.* para FIV se reduce la tasa de embarazos por embriotransferencia (Montagut y col., 1991) e incrementan las tasas de no embarazo (Knox y col., 2003) y aborto (Montagut y col., 1991; Shalika y col., 1996; Kanakas y col., 1999; Wittemer y col., 2004; Gdoura y col., 2008). Por otro lado, los procedimientos de lavado empleados en la preparación del semen previo a la FIV no son siempre eficaces en la eliminación de los micoplasmas ya que estos pueden permanecer adheridos a la superficie de los espermatozoides afectando negativamente a su calidad (Knox y col., 2003).

En el apartado 5.3 de la discusión se analiza la asociación entre la infectividad del tracto urogenital masculino y los parámetros estudiados en el análisis seminal.

Parece, pues, recomendable evitar el uso de semen contaminado/infectado con micoplasmas en los procedimientos de TRHA. En este contexto, el cribado de micoplasmas genitales en



muestras urogenitales y su posterior erradicación mediante tratamiento antibiótico, como parte del protocolo aplicado a los pacientes sometidos a TRA, puede dar lugar a importantes beneficios. En este sentido, el uso de técnicas moleculares como qPCR constituye una herramienta de gran valor diagnóstico ya que permite acortar enormemente los tiempos respecto al cultivo convencional, no se afecta por el uso previo de antibióticos y tiene una sensibilidad muy superior (Acosta y col., 2011).

Aunque el resultado de fertilidad de los pacientes no se ha incluido en este estudio, un análisis futuro de estos resultados podría completar los hallazgos mostrados con este trabajo.

*c) Como agentes causantes de efectos adversos durante la gestación e infección fetal y neonatal*

Los micoplasmas genitales (*U.parvum*, *U.urealyticum*, *M.genitalium* y *M.hominis*) son bacterias cuya presencia en la placenta y/o en el embrión en mujeres gestantes, pueden ser fuente de infección ascendente tras la rotura de las membranas. La infección por *M.hominis* y *Ureaplasma spp.* puede estar asociada a problemas graves durante el embarazo. En relación con este aspecto no hay ningún tipo de duda, se conoce la implicación de estos microorganismos en corioamnionitis, rotura prematura de membranas, placentación previa y sangrado, abortos en el último trimestre de embarazo, y/o infección grave en el recién nacido por transmisión vertical al mismo (displasia broncopulmonar, enfermedad pulmonar crónica, hemorragia intraventricular cerebral, sepsis) (Cassell y col., 1993; Kundsín y col., 1996; Knox y col., 1997; Domingues y col., 2005; Capoccia, 2013; Aydogan, 2014; Cicinelli, 2014; Murtha y col., 2014; Sweeney y col., 2017; Donders y col., 2017). Ver tabla 5.1

Los recién nacidos pueden colonizarse con Micoplasmas o ureaplasmas (o ambos) durante su paso a través de un canal de parto colonizado. La colonización neonatal tiende a no persistir. Así, aproximadamente solamente el 10% de las niñas prepúberes e incluso menos los chicos prepúberes están colonizados con *Ureaplasmas*. Después de la pubertad, la colonización ocurre principalmente como resultado de la actividad sexual. Entre los adultos, las poblaciones



desfavorecidas tienen mayores tasas de colonización, teniendo los hombres tasas más bajas de colonización genital que las mujeres (Sobouti y col., 2014).

**Tabla 5.1. Asociación micoplasma y efectos adversos sobre el embarazo**

Característica	<i>U.urealyticum</i>	<i>U.parvum</i>	<i>M.hominis</i>	<i>M.genitalium</i>
Prevalencia	8-93% (dependiendo de la técnica de detección utilizada)	80% del <i>U.urealyticum</i> previo	3-51%	0,5-1%
Co-infección	Vaginosis bacteriana	Vaginosis bacteriana	Vaginosis bacteriana	Chlamydia (en 2 de 8 estudios), NO con vaginosis bacteriana
Edad temprana	-	-	-	+++
Prácticas sexuales de riesgo	±	±	±	+++
Aborto	-	-	+ (con vaginosis bacteriana)	++
Parto pretérmino	-	+ (con vaginosis bacteriana)	+ (con vaginosis bacteriana)	++
Corioamnionitis / Rotura prematura de membranas	-	-	±	?
Transmisión al neonato	+ (pretérmino)	+ (pretérmino)	+ (pretérmino)	-

*Abreviaturas:* +, demostrada relevancia clínica; ++, relevancia clínica moderada; +++, importante relevancia clínica; -, no relevancia; ?, posible relevancia pero no demostrada. Adaptada de Donders y col., 2017

Aunque en el presente estudio no se ha estudiado, es evidente que, en cualquier tipo de embarazo sería deseable evitar estos efectos adversos siendo, además, fácilmente tratables con pautas cortas de antibióticos de bajo coste económico y con escasos efectos secundarios. De hecho, hay autores que apuntan a que el cribado de los micoplasmas genitales en las mujeres embarazadas tendría un resultado coste/beneficio favorable (Vouga y col., 2014); tanto más en las mujeres incluidas en programas de reproducción asistida que han

sido sometidas a un costoso proceso de fecundación tanto desde el punto de vista físico como psicológico o económico. En este sentido, algunos autores se posicionan categóricamente a este respecto considerando obligado el cribado y tratamiento previo en todos aquellos casos de embarazos planificados (Aydogan, 2014). La *International Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynaecology* (ISIDOG) en el 2016 publicó sus recomendaciones acerca de la importancia, necesidad de pruebas y tratamiento de micoplasmas durante el embarazo, lo cual se resume en la tabla 5.2.

**Tabla 5.2. Resumen de la ISIDOG acerca de la importancia de la necesidad de realizar pruebas y tratar los micoplasmas durante el embarazo.**

Tema	Recomendación	Nivel de evidencia
Prevalencia	Las mujeres embarazadas son normalmente portadoras de todas las especies de micoplasmas, siendo el <i>Up</i> y el <i>Uu</i> los más frecuentes, y el <i>Mh</i> y el <i>Mg</i> los menos frecuentes.	A
Epidemiología	<i>Mg</i> está asociado con prácticas de alto riesgo y edades jóvenes, pero no con VB.	A
	<i>Uu</i> y <i>Mh</i> están asociados con VB y son marcadores de VB.	A
Patogenicidad/ Complicaciones durante el embarazo	Detección de <i>Uu</i> en el líquido amniótico por PCR predice el PP y la CA en mujeres con RPM	B
	En las mujeres con trabajo de PP y membranas intactas, se requieren un alto número de <i>Uu</i> intraamniótico o signos de inflamación o coinfección para provocar el PP.	B
	<i>Mg</i> es un factor causal de PP y de aborto involuntario. Esta asociación es independiente de la presencia de Chlamydia o de VB.	A
	En estudios anteriores, <i>Uu</i> no pudo distinguirse correctamente de <i>Up</i> , que puede ser más perjudicial para el embarazo que <i>Uu</i> .	B
	En presencia de flora vaginal anormal, como en la VB, o coinfección con <i>Uu</i> , la presencia vaginal de <i>Mh</i> parece aumentar el riesgo de resultados adversos del embarazo, más que la presencia vaginal de <i>Uu</i> solo.	A
Infección neonatal/	Ureaplasma spp., especialmente <i>Up</i> , son frecuentes en neonatos prematuros y bebés de muy bajo peso al nacer, en los que causan enfermedad grave e invasiva, como la displasia broncopulmonar, ductus arterioso abierto, enfermedad pulmonar crónica, y la hemorragia intraventricular cerebral, lo que conduce a secuelas y aumento de la mortalidad. <i>Uu/Up</i> y <i>Mh</i> se transmiten a los recién nacidos (solamente patógenos en los niños prematuros), pero no <i>Mg</i> .	B
Pruebas prenatales	La prueba vulvovaginal para micoplasma es útil en mujeres con trabajo de PP o RPM, pero debería idealmente combinarse con la detección de marcadores inflamatorios en el líquido amniótico.	B
	No hay un papel para la prueba vaginal de rutina para detectar la presencia de <i>Uu</i> en todas las mujeres embarazadas a menos que sea en combinación con el screening de microflora vaginal anormal.	A
Tratamiento	En el embarazo, en la actualidad los macrólidos son los únicos medicamentos que se pueden utilizar para el tratamiento de micoplasma. La azitromicina es el fármaco de elección, pero la josamicina o la solitromicina tienen estudios prometedores para futuros tratamientos en el embarazo. Se necesitan con urgencia estudios de tratamiento para <i>Mg</i> en el embarazo.	B
	A pesar de su buena farmacocinética y promesas <i>in vitro</i> y los experimentos con animales, un solo tratamiento con eritromicina o azitromicina no es eficaz en la reducción de la tasa de complicaciones en mujeres con RPM o PP, ni impide estos resultados adversos. Una combinación de antibióticos o una mayor duración del tratamiento antibiótico no parecen modificar esta conclusión.	A
	La utilización de macrólidos en los recién nacidos infectados no son eficientes en la reducción de las complicaciones neonatales debidas a la infección por Ureaplasma, a excepción de la claritromicina.	B

*Uu: U.urealyticum; Up: U.parvum; Mh: M.hominis; Mg: M.genitalium; VB: vaginosis bacteriana; PCR: Polymerase Chain Reaction; PP: parto pretérmino; CA: corioamionitis; RPM: rotura prematura de membrana*

*d) Reducción de costes*

La incertidumbre sobre la esterilidad del semen aboca en numerosas ocasiones al uso de ICSI como técnica de fecundación en pacientes que podrían ser manejados con procedimientos de FIV convencional. Como consecuencia, el procedimiento se encarece entorno a un 7% (Navarro y col., 2006). El cribado y erradicación de microorganismos en el semen permitiría reducir notablemente el número de ICSI a favor de procedimientos convencionales más económicos. Muestra de ello es que se ha pasado de que la FIV convencional en el año del estudio en la URHA-CHUS fuera del 3% del total de ciclos realizados, frente al 10,6% del año 2018, reduciéndose el número de ICSI realizadas y consecuentemente el gasto sanitario compensando el gasto añadido de la detección de micoplasmas, además de los posibles beneficios en cuanto a tasa de embarazo, y reducción de complicaciones obstétricas y neonatales.

Por otro lado, el coste que la contaminación microbiana durante una FIV supone a nuestra población, se puede calcular estimando la prevalencia de contaminación, el número de ciclos de FIV realizados por año y el costo del procedimiento de FIV. Los estudios han indicado que la incidencia de contaminación bacteriana abierta es de aproximadamente 0,7% (Ben-Chetrit y col., 1996; Zhu y col., 2004; Kastrop y col., 2007). Aproximadamente 61806 ciclos puncionados de FIV (ovocitos propios y donados) se realizaron en España en 2016 (último Registro Nacional de Actividad, Registro SEF-2016). Esto significa que alrededor de 433 ciclos de FIV resultaron con contaminación microbiana en donde, en la mayoría de los casos, no se habrán transferido embriones. El costo estimado para estos pacientes para estas contaminaciones sería de alrededor de 8000 euros por paciente (esto no incluye la cantidad de pérdida de tiempo y otros recursos) resultando en un costo total de aproximadamente 3,5 millones de euros. Esta enorme cifra no incluye los costos de aquellos pacientes que no quedan embarazadas debido a la contaminación potencialmente no manifiesta en los cultivos embrionarios y que podrían haberse evitado/reducido mejorando consecuentemente las tasas de embarazo. Para un problema potencialmente tan generalizado parece imperativo que entendamos los efectos de estos

microorganismos en el cultivo de embriones humanos y que desarrollemos métodos para reducir estos efectos de la contaminación microbiana en el cultivo de embriones humanos.

Si bien hay razones claras para recomendar el cribado sistemático y posterior tratamiento de los casos positivos, no lo son tanto para tener como objetivo la descolonización completa. En los pacientes en que se detecte persistencia bacteriana a pesar de un tratamiento adecuado y correctamente pautado, la instauración de ciclos sucesivos de tratamiento antibiótico con el fin de conseguir la completa descolonización puede acarrear más perjuicios que beneficios por las siguientes razones. En primer lugar, el uso abundante de antibióticos puede dar lugar al desarrollo de resistencias frente a los mismos. En segundo lugar, retrasa el momento de la FIV además de incrementar, por ello, la ansiedad en algunas parejas. Por último, y quizás el aspecto más relevante, sea la alteración de la microbiota vaginal que se produciría en tratamientos múltiples y prolongados. Existe cada vez más evidencia de la importancia que la microbiota vaginal tiene en la fertilidad y éxito de la FIV (Kroon y *col.*, 2018). De hecho, la reducción de la proporción de lactobacilos (*Lactobacillus crispatus* <90%) y su suplantación por otras bacterias (enterobacterias, estreptococos, microbiota asociada a vaginosis bacteriana) es un factor independiente asociado a menores tasas de éxito en la embriotransferencia (Sirota y *col.*, 2014).

Así pues, debe recomendarse el cribado y tratamiento de micoplasmas genitales pero no la erradicación absoluta como objetivo final. Posiblemente, la implementación futura de técnicas moleculares que cuantifiquen la carga bacteriana permitirá diferenciar con mayor claridad entre los pacientes que deben ser tratados y los que no, así como la eficacia de los tratamientos y su repercusión clínica.

#### 5.2.2.2 Tratamiento de micoplasmas

Según las recomendaciones de las guías terapéuticas, el tratamiento de elección para las infecciones por *Ureaplasma spp.* son los macrólidos, doxiciclina o levofloxacino como alternativa. En el caso de *M.hominis* el tratamiento de elección es doxiciclina y como

alternativa quinolonas (Horner y col., 2016; Mensa y col., 2017). Siguiendo las propuestas de tales guías se decidió utilizar azitromicina para erradicar *Ureaplasma spp.* en ambos miembros de las parejas en las que el hombre fue positivo ya que, además de ser una opción de primera línea, la pauta para este antibiótico facilita la adherencia al tratamiento. Por esta misma razón se decidió su uso en los casos de coinfección *Ureaplasma/M.hominis* a pesar de que los macrólidos no son una opción recomendable para el tratamiento de *M.hominis*.

Así, en los casos de positividad en el varón para *U.urealyticum/parvum* se instauró tratamiento antibiótico en ambos miembros de la pareja para posteriormente confirmar si se conseguía la negativización en ambos o por lo menos en uno de los miembros de la pareja. Tras instaurar tratamiento con azitromicina 1 g/vía oral en dosis única, se confirmó que, por lo menos en nuestro medio, no resulta efectivo para erradicar el *U.urealyticum/parvum*. Por el contrario la doxiciclina en dosis de 100 mg vía oral, dos veces al día durante siete días, resultó efectiva en el 79% de los casos. En los casos de fracaso terapéutico para ambos antibióticos se recurrió al levofloxacin y como último recurso a la clindamicina.

De los 8 casos de infección por *M.hominis* (6/8 de ellos en coinfección con *U.urealyticum/parvum*, 75%) las dos primeras parejas se trataron con azitromicina porque tenían coinfección con *U.urealyticum/parvum*, y con doxiciclina las seis restantes. El tratamiento con azitromicina no fue efectivo en 3 pacientes (2 de ellos miembros de la misma pareja), y lo mismo ocurrió con el tratamiento de doxiciclina. Estos casos de no negativización hubo que tratarlos con moxifloxacino, consiguiéndose su negativización.

En conclusión, en nuestros pacientes y según los datos obtenidos en el estudio, el tratamiento de primera elección para los micoplasmas debe ser con doxiciclina, y en caso de no ser efectivo se recurrirá a las quinolonas dejando como último recurso a la clindamicina.

Existen numerosas publicaciones sobre las tasas de resistencia frente a azitromicina, “in vitro”, encontradas en *M.hominis* y *Ureaplasma spp.* aislados de distintos tipos de muestras genitales (Redelinghuys y col., 2014; Schneider y col., 2015; Horner y col., 2016; Lee y col., 2016). En estos trabajos azitromicina se presenta

como un antibiótico altamente eficaz frente a *Ureaplasma spp.* con muy bajo porcentaje de cepas resistentes. Sin embargo, los resultados “in vivo” obtenidos en la serie del presente estudio, utilizando las pautas de tratamiento recomendadas para el caso de infecciones de transmisión sexual (1g en dosis única), demostraron una baja eficacia de este macrólido por lo que, tras los primeros resultados, se optó por pasar al uso de doxiciclina (doxiciclina 100 mg vía oral, dos veces al día durante siete días) como tratamiento de primera elección. Se han publicado trabajos demostrando que azitromicina en dosis única es menos eficaz que usada en pautas de mayor duración (Skerk y col., 2001) lo cual podría justificar la baja eficacia en la serie estudiada.

Otra cuestión interesante observada es la mayor tasa de fracaso terapéutico del tratamiento antibiótico frente a *Ureaplasma spp.* en las mujeres respecto a los hombres siendo estadísticamente significativa esta diferencia ( $p < 0,01$ ) en el caso de azitromicina. El reducido número de casos de infección por *M.hominis* no permite extraer conclusiones a este respecto. Por otro lado, nuestros resultados son coherentes con las probabilidades de éxito/fracaso deducidas de las tasas de resistencia frente a estos antibióticos publicadas en diversos estudios en Europa según los cuales, los porcentajes de resistencia frente a macrólidos y tetraciclinas estarían alrededor del 54% y 8%, respectivamente (Pignanelli y col., 2015).

Como alternativa terapéutica para los casos en los que el tratamiento con doxiciclina no consigue erradicar la colonización por micoplasmas genitales se utilizaron las quinolonas (levofloxacino y moxifloxacino). Levofloxacino fue ineficaz en una pareja colonizada por *Ureaplasma spp.* y en una en coinfección con *M.hominis*. A pesar de que levofloxacino se sugiere como un antimicrobiano eficaz frente a *Ureaplasma spp.* y *M.hominis* (Krausse y Schubert, 2010), nuestros resultados no apuntan en esa dirección ya que en un cuarto de los pacientes tratados con este antibiótico hubo fracaso terapéutico. No obstante, debido al reducido número de casos, no podemos sacar conclusiones definitivas en este aspecto. Dado que moxifloxacino se propone como un antibiótico potente frente a *M.hominis* (Krausse y Schubert, 2010) se utilizó con éxito como tratamiento alternativo en una pareja colonizada por este microorganismo con fracaso previo por

levofloxacino (pareja 104). Volvió a ser positiva para *U.urealyticum/parvum* pero no se tomó ninguna medida dado que se alargaba el inicio del ciclo de FIV y la pareja renunció a una nueva pauta antibiótica.

Otra de las terapias alternativas que se usaron para el tratamiento de la infección por micoplasmas no resuelta tras el tratamiento con tetraciclinas y macrólidos fue la clindamicina. De hecho, este antibiótico es habitualmente utilizado para tratar la vaginosis bacteriana en la que *M.hominis* es uno de los patógenos presentes. Aunque *Ureaplasma spp.* se considera intrínsecamente resistente a lincosamidas dado el bajo porcentaje de cepas sensibles encontradas (Krausse y Schubert, 2010; Lee y col., 2016), decidimos utilizar clindamicina como tratamiento de tercera línea en las mujeres en las que se había observado fracaso terapéutico con azitromicina, doxiciclina y/o levofloxacino debido a la posibilidad de administrarlo en forma de óvulos vaginales y, por tanto alcanzar altas concentraciones a nivel local. De hecho, en uno de los casos se consiguió la erradicación de *Ureaplasma spp.* (pareja 10). La otra paciente (pareja 159) recibió dos cursos de clindamicina vía vaginal, el segundo de ellos acompañado de probióticos, permaneciendo positiva la detección de *U.urealyticum* pero no se tomó ninguna medida dado que se alargaba el inicio del ciclo de FIV y la pareja renunció a una nueva pauta antibiótica.

En conclusión, tras la detección por qPCR de micoplasmas genitales en los pacientes incluidos en el programa de reproducción humana asistida de nuestra área sanitaria la doxiciclina fue significativamente más efectiva que la azitromicina para conseguir la erradicación de micoplasmas genitales por lo que se recomienda su uso como antibiótico de primera elección. Tras los primeros resultados post tratamiento de los individuos a estudio y coincidiendo con la publicación de la Guía Europea 2016 para el manejo de las uretritis no gonocócicas (Horner y col., 2016), cambiamos la pauta de tratamiento siendo la recomendada actualmente más efectiva.



### 5.2.3 *N.gonorrhoeae* y *C.trachomatis* en O1

#### 5.2.3.1. *N.gonorrhoeae*

No se detectó *N.gonorrhoeae* en ninguno de los 205 pacientes analizados. En 2017 se declararon en Galicia 248 casos de gonorrea lo que supone un aumento del 26% respecto a 2016. De hecho, la incidencia está volviendo a niveles del año 2000 (pico entre 20 y 29 años) (Dirección General de Salud Pública, 2017). Las características de la población estudiada en el presente trabajo en relación con su carácter asintomático (no secreción uretral), con una mediana de edad de 36 años y relaciones supuesta o mayoritariamente estables dentro de una pareja que busca descendencia, podrían justificar la ausencia de este patógeno asociado a ITS.

#### 5.2.3.2. *C.trachomatis*

La infección por *C.trachomatis* es la ITS bacteriana más frecuentemente declarada en los países industrializados (Bezold y col., 2007; Cunningham y Beagley, 2008; Guidance on Chlamydia control in Europe, 2015). Puede afectar cualquier localización del tracto urogenital masculino y femenino persistiendo durante largos períodos de tiempo. No obstante, en la mayor parte de los casos, hasta un 50% en los hombres y un 80% en las mujeres, suele ser asintomática (Nogales y col., 2007; protocolo asistencial uretritis/cervicitis aprobado por la Comisión de Infección Hospitalaria, Profilaxis y Política Antibiótica del Hospital Universitario Son Dureta, 2010). Una de las consecuencias más graves de esta infección inaparente y prolongada es su impacto sobre la fertilidad tanto masculina como femenina. En el caso de los varones, la inflamación y obstrucción crónica del epidídimo se asocia a azoospermia (Ombelet y col. 1997; Wagenlehner y col., 2006; Weidner, 2008 a, b), altas tasas de FDE y pobre calidad espermática (Cunningham y Beagley, 2008) acompañándose de disminución del volumen espermático. Por otro lado, la adhesión e internalización en los espermatozoides repercute en su movilidad y morfología (Veznik y col., 2004; Dieterle, 2008). En el caso de las mujeres, las consecuencias pueden ser la enfermedad



inflamatoria pélvica (EIP), esterilidad y embarazo ectópico y en el recién nacido la conjuntivitis folicular y la infección respiratoria.

En muchos países, incluyendo España, la detección de *C.trachomatis* no es parte de la atención prenatal de rutina debido a la falta de pruebas en ensayos controlados aleatorizados que evidencien que un programa de cribado pudiera ser coste-efectivo. No obstante, algunos estudios demuestran la potencial utilidad y eficacia del cribado de *C.trachomatis* en la mujer embarazada que podría llegar a suponer un ahorro de costes de hasta el 16% (Rours y col., 2016).

Actualmente, la legislación española solo exige el cribado de *C.trachomatis* en los donantes de semen mediante PCR en orina (REAL DECRETO 1301/2006). Obviamente, la finalidad de esta disposición es la de evitar la transmisión de la infección del donante a la mujer. Sin embargo, el cribado dentro de las parejas podría evidenciar todos aquellos casos en los que esta infección pueda ser la causa de la esterilidad e, incluso, conseguir su reversión con un tratamiento adecuado evitando, además, los potenciales efectos adversos que sobre la gestación y el neonato puede tener la infección por *C.trachomatis*. De hecho, se ha demostrado la ineficacia de las técnicas de lavado en la preparación del semen constatándose tras las mismas hasta un 46% de muestras positivas por PCR (2,7-18% de la carga bacteriana inicial prelavado seminal (Al-Mously y col., 2009). Tampoco parece que la eficacia de los lavados esté relacionada con la carga bacteriana (Al-Mously y col., 2009). Una de las posibles causas puede ser la asepsia durante la realización de la técnica de gradientes, aunque en el estudio de Al-Mously y col. se siguió una asepsia estricta en los distintos pasos de la técnica de lavado, cambiando pipetas y tubos en cada uno de los pasos realizados. Otra de las razones puede ser que una vez que la bacteria se adhiere al espermatozoide es muy difícil despegarla de este por los medios físicos o químicos utilizados durante los procedimientos de lavado.

En la población objeto de estudio se encontró una prevalencia del 1%. Bezold y col. tras evaluar 241 hombres estériles encontraron una prevalencia del 2,5% (Bezold y col., 2007). En otros estudios de cribado poblacional realizados en nuestro país, la prevalencia en hombres se establece entre el 3,9 y el 4,9 % (Fernández Benítez y col.,

2012). Las estimaciones de prevalencia realizadas por el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) sitúan la prevalencia masculina en el 3,5% en Europa (del 0,4% en Alemania al 6,2% en Noruega) con un máximo entre los 15-24 años (Guidance on Chlamydia control in Europe, 2015). Teniendo en cuenta la mediana de edad de los pacientes en protocolo FIV en el CHUS podemos considerar que la prevalencia del 1% encaja perfectamente en los resultados publicados por el ECDC según los que se observa un descenso significativo de la incidencia de esta infección a partir de los 25 años especialmente acusado a partir de los 35 (Guidance on Chlamydia control in Europe, 2015). Considerando que este grupo se comporta mayoritariamente con actividad sexual dentro de la pareja, los resultados pueden ser superponibles a los de otros cribados realizados en mujeres embarazadas como es el estudio de Piñeiro y *col.* en el que la prevalencia es del 2% entre 25 y 29 años cayendo al 0,5% a partir de los 29 (Piñeiro y *col.* 2016).

De acuerdo con las guías terapéuticas vigentes, el tratamiento de elección para la infección por *C.trachomatis* es la doxiciclina 100 mg vía oral, dos veces al día durante 7 días (Horner y *col.*, 2016). Aunque no hay evidencia de resistencia a antibióticos terapéuticos en cepas de *C.trachomatis* en humanos, en los últimos años se han comunicado fracasos en pacientes tratados con azitromicina en pauta de 1g en monodosis. Algunos de ellos podrían explicarse por reinfección, mal cumplimiento, intolerancia al tratamiento, o controles postratamiento demasiado precoces que, incluso pueden estar detectando restos de ADN de bacterias no viables. Los dos casos encontrados fueron tratados con éxito con doxiciclina.

A pesar de que la prevalencia detectada ha sido baja, teniendo en cuenta la potencial gravedad de la infección por *C.trachomatis* sobre la salud femenina y la capacidad reproductora en ambos miembros de la pareja, el riesgo de infección en el recién nacido y los efectos adversos durante el embarazo que pueden llegar a malograr el resultado final del procedimiento de reproducción asistida y la simplicidad y eficacia del tratamiento antibiótico curativo, es perfectamente razonable aconsejar la inclusión del cribado para *C.trachomatis* en los pacientes sometidos a TRHA. Incluso, teniendo

en cuenta que se ha demostrado la discordancia en la prevalencia en el cribado de parejas asintomáticas (López-Corbeto y *col.*, 2016) debe considerarse que el cribado en uno solo de los miembros de la pareja podría infraestimar significativamente la infección dentro de la misma y, por tanto, para conseguir el diagnóstico correcto en el 100% de los casos debería realizarse el cribado simultáneamente en los dos miembros de la pareja.

#### 5.2.4 VPH

Los virus del papiloma humano son los causantes de la infección de transmisión sexual más común. La infección en el hombre se considera transitoria y, normalmente, se aclara espontáneamente con el tiempo y se encuentra frecuentemente en verrugas genitales. Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo ni estrategia de control de la infección por VPH en el hombre. También se ha documentado su presencia en el tracto urogenital masculino (testículo, epidídimo y conducto deferente) (Berry y *col.*, 1987; Moore y *col.*, 1989; Wortley y *col.*, 1998; Bayasgalan y *col.*, 2004; Foresta y *col.*, 2011a) y en el semen (Wortley y *col.*, 1998; Laprise y *col.*, 2014).

Se estima que la prevalencia en la población general es de alrededor del 40% (Bosch y *col.*, 2013), en pacientes con verrugas genitales del 53,8%, en hombres con parejas infectadas del 40,9% y del 10,2% en pacientes estériles frente al 2,2% en los controles fértiles (Foresta y *col.*, 2010). Otros estudios prospectivos, metaanálisis y revisiones sistemáticas de la bibliografía también encuentran mayores prevalencias en el grupo de pacientes estériles (Foresta y *col.*, 2010; Perino y *col.*, 2011; Schillaci y *col.*, 2013; Laprise y *col.*, 2014; Luttmer y *col.*, 2016). En muchos de los casos se han detectado coinfecciones por dos o más genotipos así como la presencia de genotipos oncogénicos (Kaspersen y *col.*, 2011). En los pacientes estudiados en el presente estudio se obtuvo una prevalencia del 1,5% de genotipos de alto riesgo no 16/18. Este valor es claramente inferior al de otros estudios previamente mencionados y a datos publicados en España (35%, CAV-AEP, 2018), pero similar al 2% de VPH-ADN 6/11 detectado en el semen de hombres sin lesiones detectables colposcópicamente (Aynaud y *col.*, 2002). Este valor de prevalencia

debería variar en los bancos de semen en función de los criterios de calidad seminal establecidos para la selección de donantes, siendo mayor en bancos de semen que acepten a donantes con concentraciones y movilidades más bajas.

Sin embargo, no es posible realizar una comparación directa entre estos datos ya que hay que tener en cuenta que:

1. no existe un método estandarizado para el estudio de VPH en semen,
2. la PCR (usada en este trabajo) es menos sensible que otras técnicas basadas en hibridación (FISH) utilizadas en algunos trabajos que detectan el virus en la zona ecuatorial de la cabeza del espermatozoide a través de la interacción entre la proteína de la cápside VPH L1 y syndecan-1 (Foresta y *col.*, 2008),
3. la técnica de PCR empleada solo detecta catorce genotipos de alto riesgo mientras que en otros trabajos se detecta VPH sin diferenciar entre genotipos.

Así pues, considerando los resultados de otros trabajos (Kaspersen y *col.*, 2011) según los que se detectan genotipos oncogénicos en un 66,7% de los casos, que la prevalencia va del 10 al 35%, y que solo se han buscado 14 genotipos de alto riesgo en el presente trabajo, la prevalencia real en nuestro grupo de estudio será probablemente mayor. Otro aspecto a tener en cuenta es la edad y situación social de los pacientes estudiados que se relaciona con comportamientos sexuales más conservadores y que, dado el carácter transitorio de la infección, posiblemente explica, al menos en parte, el hallazgo de una prevalencia más baja.

La infección por VPH se ha asociado con motilidad reducida del espermatozoide y astenozoospermia idiopática (Schillaci y *col.*, 2013; Foresta y *col.*, 2015). Además, en los pacientes estériles con semen infectado por VPH, hay significativamente más anticuerpos anti-espermatozoides y en estos casos la motilidad aún es más reducida (Garolla y *col.*, 2013). Para obtener una eliminación significativa (aproximadamente del 85,3%) tanto de la infección del semen del VPH como de los anticuerpos, se necesitan al menos 24 meses de seguimiento. Curiosamente la curación de la infección del semen cursa paralela a la desaparición de los anticuerpos y se relaciona

significativamente con una mejora progresiva de la motilidad espermática (Garolla y *col.*, 2013). Por esta razón, consideran que los pacientes estériles en programas de reproducción asistida con resultados positivos para anticuerpos antiespermatozoides deben ser estudiados para VPH. En el presente estudio los casos de positividad para VPH en el semen no han sido suficientes para evaluar su relación con los parámetros seminales.

Por otro lado, a la hora de determinar la utilidad y conveniencia de realizar el cribado de VPH entre los pacientes en reproducción asistida es muy importante tener en cuenta que los métodos convencionales de lavado del semen no consiguen eliminar el VPH del mismo. La baja eficacia de las técnicas convencionales (gradientes de densidad y swim-up) para la eliminación del VPH, posiblemente por su adhesión a la cabeza y al cuello de los espermatozoides ya que su integración nuclear no está clara (Foresta y *col.*, 2011b), aumenta el interés por la utilidad del cribado del semen previo a las TRHA. Se ha ensayado la técnica de swim-up modificada con heparinasa-III para eliminar el VPH (Garolla y *col.*, 2012). A pesar de que esta última parece prometedora, la pregunta sigue siendo si los viriones pueden ser eliminados o el espermatozoide infectado es un vector para la transmisión del VPH al interior de los ovocitos fertilizados, incluso utilizando la ICSI (Lai y *col.*, 1996; Chan y *col.*, 1996; Foresta y *col.*, 2011a). De hecho, los espermatozoides infectados son capaces de transferir los genes E6 / E7 del VPH y la proteína de la cápside L1 a los ovocitos (Foresta y *col.*, 2011a) donde los genes víricos pueden ser activados y transcritos. Una vez dentro, el VPH oncogénico tipo 16 y 18 es capaz de inhibir el desarrollo de embriones solo en el estadio de 2 células, y provocar una reducción en la tasa de formación de blastocistos (Henneberg y *col.*, 2006). De acuerdo con datos publicados, la presencia de VPH en semen parece repercutir negativamente en el resultado de las TRHA ya que disminuye las tasas de fecundación y de gestación aumentando las de aborto (Perino y *col.*, 2011; Garolla y *col.*, 2012; Yang y *col.* 2013; Garolla y *col.*, 2016; Zacharis y *col.* 2018). Cuando ambos compañeros tienen la infección por VPH, todos los embarazos resultan en abortos espontáneos (Perino y *col.*, 2011).

Igualmente cuando el VPH es detectado en las mujeres en la citología cervical, al realizar ciclos de inseminación intrauterina, el embarazo es seis veces menos probable que ocurra (1,87% vs. 11,4%), existiendo también una mayor tasa de aborto (40% vs. 13,7%) (Depuydt y *col.*, 2016).

De acuerdo con estos datos, parece obvio el interés que puede tener el cribado de VPH de alto riesgo en el semen de donantes; sin embargo, el caso de semen procedente de la pareja es más controvertido. Una opción para hombres con VPH positivo es esperar al aclaramiento del virus que es de aproximadamente de siete meses para los hombres (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008; Giuliano y *col.*, 2011). Por otra parte, la detección de VPH en los espermatozoides podría justificarse por las pérdidas de embarazo (Perino y *col.*, 2011; Garolla y *col.*, 2016; Spandorfer y *col.*, 2006).

En la actualidad, dado que no hay ningún tratamiento efectivo ni una estrategia de control para la infección por VPH en hombres, así como tampoco un método validado de detección en semen, y sobre la base de las evidencias expuestas, se sugiere realizar PCR en semen y exudado del pene para detectar la presencia de VPH en los casos de astenozoospermia idiopática, presencia de anticuerpos antiespermatozoides, esterilidad de origen desconocido, historia clínica de enfermedades relacionadas con el VPH y evidencias de infección por VPH (aquellos con verrugas genitales y parejas infectadas), en particular en aquellos hombres donantes de semen y en los que van a realizar TRHA. Si el resultado es positivo y no es posible retrasar la búsqueda de fertilidad, como es el caso de parejas estériles mayores, se sugiere realizar ICSI con un tratamiento previo de los espermatozoides con heparinasa-III para mitigar la presencia viral (Foresta y *col.*, 2015). En las parejas más jóvenes, dado que el aclaramiento promedio en hombres se estima en 5,9 meses (IC 95%: 5,7–6,1) (Lenzi y *col.*, 2013), se sugiere un seguimiento a los 6 meses desde el primer diagnóstico, realizando una nueva PCR para evaluar el posible aclaramiento espontáneo de la infección viral. En caso de persistencia de la infección, será necesario un asesoramiento adicional y un seguimiento de otros 6 meses, siempre que sea posible, para

permitir un aclaramiento espontáneo tras 12 meses (Foresta y *col.*, 2015).

En el caso de positividad en las mujeres, se ha demostrado que el tiempo de aclaramiento de la infección por VPH es de aproximadamente 1 año (Zhang y *col.* 2012). En el caso de VPH de alto riesgo es mayor del 50% a los 6 meses, alcanzando más del 90% a los 3 años (Bosch y *col.*, 2013).

Por todo lo anteriormente expuesto, el uso de semen libre de VPH en las TRHA ayudaría a aumentar el éxito de las TRHA y disminuiría la exposición a VPH en las mujeres usuarias de estas técnicas, así como a mejorar los resultados obstétricos de los embarazos obtenidos.

### **5.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LA INFECCIÓN DEL TRACTO UROGENITAL MASCULINO Y LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS EN EL ANÁLISIS SEMINAL.**

Aunque actualmente existe un debate abierto permanente acerca del papel de las infecciones de las glándulas accesorias masculinas en la esterilidad masculina, hay estudios que las consideran un factor de riesgo para la misma (Bayasgalan y *col.*, 2004).

Se ha demostrado que los mediadores intercelulares generados durante la respuesta inflamatoria, como la que se produce a consecuencia de una infección, tienen efectos negativos sobre la funcionalidad de los espermatozoides y sus células precursoras (Agarwal y *col.*, 2003; Sanocka y *col.*, 2003). Estos mediadores incluyen especies reactivas de oxígeno y citoquinas (Ochsendorf, 1999; Vicari, 2000; Vicari y Calogero, 2001; Vicari y *col.*, 2002; Weidner y *col.*, 2002; Diemer y *col.*, 2003a) que pueden persistir incluso después de un tratamiento efectivo con antimicrobianos. Como consecuencia, la capacidad antioxidante del plasma seminal se agota progresivamente y no puede ser restaurada debido a que, en estos casos, las glándulas accesorias masculinas presentan disfunción.

Numerosos estudios describen como la presencia de microorganismos en el tracto genital masculino se relaciona con anormalidades en los parámetros del semen, particularmente con la movilidad de los espermatozoides, y la función espermática



mitocondrial y/o la integridad del ADN (Agarwal y *col.*, 2003; Sanocka y *col.*, 2003). Un reciente meta-análisis, el único existente hasta la fecha, ha conseguido reunir toda la evidencia disponible en la literatura internacional para evaluar la influencia de la bacteriospermia en la calidad del semen y la esterilidad masculina (Pergialiotis y *col.*, 2018). Según el mismo, la presencia de bacterias en el eyaculado, disminuye significativamente la concentración total de espermatozoides, la motilidad progresiva y la morfología normal, aunque difiere según el tipo de bacteria presente, y por lo tanto recomienda a los clínicos realizar cultivos de semen de rutina al evaluar las parejas estériles y tratar las infecciones potenciales, a pesar de la falta de evidencia del efecto de los antibióticos en los parámetros del semen. También recomienda que futuros estudios deberían centrarse en el impacto de las distintas bacterias sobre los parámetros seminales que corroboren los hallazgos del meta-análisis. Es aquí donde el presente trabajo contribuye a mejorar el conocimiento científico.

El hecho de que muchos de los microorganismos encontrados en el TREM puedan comportarse como patógenos o comensales dificulta la interpretación de los hallazgos microbiológicos. En este sentido, la introducción de técnicas que permitan la cuantificación de la carga bacteriana puede ser de gran ayuda a la hora de diferenciar entre colonización e infección. En el caso de los cultivos bacterianos convencionales esto es sencillo, como se ha descrito previamente, con la técnica de Meares y Stamey se puede diferenciar entre colonización e infección desde el punto de vista microbiológico ya que existe abundante conocimiento respecto a los umbrales que marcan la diferencia entre una y otra situación. Sin embargo, en el caso de técnicas moleculares, debido a su mayor sensibilidad, no necesariamente la detección de ciertos microorganismos está asociada a infección. Tal es el caso del grupo de los micoplasmas genitales en los que no existe experiencia suficiente para establecer un punto de corte como criterio diferenciador entre infección y colonización. A esto se suma la dificultad de estandarizar la medida de la carga bacteriana en relación con el tipo y características de la muestra. Es por tanto necesario hacer constar que los resultados expuestos en este



estudio proceden de técnicas cualitativas por lo que los resultados del análisis de los mismos en relación con las características del semen podrían no ser los mismos en el caso de haber trabajado con datos cuantitativos. Es importante tener presente esta cuestión ya que, una de las posibles causas de la controversia en relación con la patogenicidad de los micoplasmas genitales es la disparidad de resultados entre los distintos estudios que, al margen de las diferencias metodológicas podría deberse precisamente a que sea la carga y no la presencia/ausencia, el parámetro que mejor correlacione con la clínica presentada por los pacientes. De hecho, existen trabajos en los que mediante técnicas moleculares se observa asociación con patología en los casos de cargas virales elevadas (Deguchi y col., 2015; Shimada y col., 2014).

El análisis estadístico de los datos de la población a estudio demuestra asociación significativa entre la presencia de micoplasmas y un porcentaje inferior de espermatozoides PR y superior de espermatozoides INM, dando respuesta a los aspectos no estudiados en su día por Andrade-Rocha. Este autor investigó el valor clínico de *U.urealyticum* en el análisis de semen de rutina, y afirmó que su prevalencia era mayor que la de *M.hominis*, coincidiendo con los resultados de este estudio, pero que a pesar de la alta incidencia de micoplasmas, no se disponía en aquel momento de información suficiente sobre la influencia de estos microorganismos en la calidad espermática y su relación con el recuento de leucocitos, por lo tanto, el cribado de *U.urealyticum* y *M.hominis* para el análisis de semen de rutina no lo consideró clínicamente relevante (Andrade-Rocha, 2003). Resultados similares a los del presente estudio han sido observados recientemente por Voulgaridis al demostrar que es 1,95 veces más probable que una muestra se encuentre infectada si la motilidad progresiva es inferior al 53,6% siendo estadísticamente significativo (valor de  $p < 0,001$ ) (Voulgaridis, 2018). También Hannachi y col., demostraron que la presencia de astenozoospermia era mayor en los hombres con bacteriospermia, siendo el *U.urealyticum* el germen más frecuente (45,7%) (Hannachi y col., 2018).

Al estudiar posibles variables de interacción, estos mismos resultados se observaron con el hecho de ser o no fumador, por lo que

el tabaco cambia la intensidad del efecto objeto de estudio que es la ITREM y las variables dependientes PR e INM en el mismo sentido de la asociación. Así el tabaco es una variable de interacción que modifica el efecto en la relación de la variable de exposición ITREM y las variables resultado porcentaje de espermatozoides PR y porcentaje de espermatozoides INM. Aunque el REM fue mayor en no fumadores, lógicamente por presentar mayor porcentaje de espermatozoides PR, esto mismo no llegó a ser significativo en los hombres sin ITREM pero sí se recuperan más espermatozoides progresivos. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores (Sharma y *col.*, 2016; Asare-Anane y *col.*, 2016; Mostafa y *col.*, 2018), al demostrar que el tabaco afecta a la movilidad espermática. Una revisión sistemática y metaanálisis muy reciente de Bundhun y *col.*, donde incluyen cuatro estudios entre 2002 y 2012, y donde se evalúa si el tabaco provoca astenozoospermia, el riesgo global de presentar astenozoospermia es de 1,42, aunque no llega a la significación estadística ( $p = 0,07$ ) (Bundhun y *col.*, 2019). La diferencia con el presente estudio es que lo que se evalúa es la presencia de astenozoospermia y no si reduce globalmente la movilidad. De hecho, el tabaco como demuestra el presente estudio, reduce el porcentaje de espermatozoides progresivos, pero puede no ser suficiente la reducción para provocar astenozoospermia dado que la media de progresivos de los fumadores es 33,03% y la de los no fumadores 38,58%, en ambos casos medias dentro del rango de normalidad de los parámetros de la OMS 2010 (31-34%). Además también depende del número de cigarrillos diarios consumidos como ya han demostrado otros trabajos al encontrar una relación directa entre la extensión del consumo de cigarrillos y el grado de empeoramiento de la motilidad progresiva (Mostafa y *col.*, 2018).

Otro parámetro seminal afectado por la presencia de microorganismos en las vías genitourinarias es la viscosidad que se encuentra significativamente aumentada. Esta mayor viscosidad puede reducir la movilidad, por ello se ha asociado con astenozoospermia y con características específicas del movimiento de los espermatozoides (Elzanaty y *col.*, 2004).

Los pacientes con colonización/ITREM y concretamente por micoplasmas y *C.trachomatis*, presentaron alteración de la morfología espermática, concretamente elongación de la cabeza (piriforme, delgada, afilada), microcefalia y presencia de residuo citoplasmático. Coincidiendo con estos resultados obtenidos, un estudio reciente ha descrito que la elongación de la cabeza espermática, la microcefalia, el acrosoma anormal o presencia de residuo citoplasmático es frecuente en las infecciones del TREM y el varicocele (Voulgaridis, 2018). Voulgaridis establece el punto de corte en el 75% (3er cuartil) de los porcentajes observados de cabezas alargadas, correspondiendo el 3er cuartil al 36%. Con este corte, observó que en el análisis logístico univariado con respecto a la posibilidad de detectar un microorganismo cuando el porcentaje de cabezas alargadas es  $> 36\%$  no encuentra un odds ratio estadísticamente significativo ( $p = 0,158$ ); pero curiosamente sí encontró significación estadística, al igual que el presente estudio, al considerar únicamente los casos con presencia de *C.trachomatis*, *U.urealyticum* o *M.hominis*. Así, el análisis logístico univariado reveló que si el porcentaje de cabezas alargadas es  $> 36\%$ , es 1,49 veces más probable ( $p < 0,002$ ) detectar uno de los tres microorganismos previamente mencionados en comparación con los sémenes donde el porcentaje de cabezas alargadas llega hasta un 36%. La misma asociación se encontró en los casos con positividad del presente estudio que curiosamente son para *C.trachomatis*, *U.urealyticum* o *M.hominis*, siendo 4,49 veces más probable ( $p < 0,001$ ) detectar uno de los tres microorganismos.

De la misma forma Voulgaridis y en el estudio se encontró relación significativa (mismo corte en el 3er cuartil) entre la presencia de alguno de los tres microorganismos con la presencia de residuo citoplasmático (4%; OR: 1,59,  $p < 0,001$  y OR: 145,8,  $p < 0,0001$ ) respectivamente), y de microcefalia (21%; OR: 1,79,  $p < 0,002$  y OR: 12,04,  $p < 0,0001$  respectivamente). En cambio, así como Voulgaridis encuentra significación estadística, el estudio no la encuentra en cuanto a acrosoma anormal (88%; OR: 2,58,  $p < 0,001$  y OR: 0,989,  $p = 0,987$  respectivamente), y espermatozoides de cabeza delgada (7%; OR: 1,38,  $p < 0,010$  y OR: 1,18,  $p = 0,803$ ). Estos datos recientes harán necesario establecer conjuntamente con *Microptic*® (empresa

distribuidora del software SCA<sup>®</sup>) los valores de normalidad para las distintas anomalías morfológicas detectadas en la cabeza o pieza intermedia del espermatozoide.

El movimiento progresivo presupone una correcta estructura del cuello y la cola del espermatozoide, mientras que la forma ovalada de la cabeza es ventajosa en lo que respecta a velocidad. Es importante entender que la morfología anormal expresa la dificultad del espermatozoide para fecundar al óvulo, por ello los espermatozoides anormales no se consideran "no útiles", ya que a pesar de su alteración morfológica aún pueden fecundar mediante técnicas como la ICSI. Los defectos estructurales podrían disminuir la capacidad de fecundación negativamente al influir en la motilidad progresiva o en la fusión de los gametos. Las anormalidades morfológicas también pueden indirectamente afectar negativamente al resultado de un embarazo ya que pueden coexistir con una alta incidencia de FDE debido a un factor de estrés, o pueden estar asociados a infecciones, obviamente compartido con la pareja, alteraciones estas capaces de causar aborto.

Por otro lado, en el presente estudio, los hombres que tienen PMN en el eyaculado tienen el doble de riesgo de presentar microorganismos en el tracto urogenital que los hombres que no tienen PMN en su semen, aunque la asociación no fue estadísticamente significativa al igual que entre la presencia de leucocitospermia y la presencia de microorganismos. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Golshani, de que la leucocitospermia es un mal marcador de bacteriospermia, aunque sí advierte de un proceso inflamatorio (Golshani, 2006). Ahora bien, la opinión mayoritaria es que la leucocitospermia siempre va ligada a bacteriospermia; sin embargo la no presencia de leucocitospermia no excluye el desarrollo de síntomas genitourinarios de enfermedad (Potts y col., 2000). Monem y col. confirmaron esta opinión dado que en su estudio, el 62% de los hombres estériles leucocitospérmicos mostraron bacteriospermia asociada (Monem y col., 2013).

Así, la comparación de los parámetros del análisis de semen estándar entre las parejas masculinas de las parejas estériles con y sin infección genital mostró que la presencia de ITREM se asocia

negativamente con el porcentaje de espermatozoides PR y positivamente con el porcentaje de espermatozoides INM. Así, aunque la cantidad de espermatozoides con movimiento progresivo es esencial en lo que respecta a la fecundación, su porcentaje y morfología también es buen índice de la condición de salud del tracto urogenital masculino.

Los valores medios de edad del hombre, volumen seminal, pH, número de espermatozoides en millones/mL, porcentaje de espermatozoides NPR, porcentaje de espermatozoides con morfología normal, REM y porcentaje de espermatozoides vivos, así como la presencia de agregados espermáticos, la presencia de aglutinación espermática, la presencia de cabezas delgadas y el diagnóstico de astenozoospermia, no se relaciona significativamente ya sea para la detección de ADN de micoplasmas genitales o para la detección de ADN de ureaplasmas en muestras de O1, VPH en semen, o bacterias en O1, O2, semen u O3.

#### 5.4 ITREM Y ESTERILIDAD TUBÁRICA

La alteración del factor tubo-peritoneal constituye una de las causas más frecuente de esterilidad. La asociación de esta condición a la infección por patógenos de transmisión sexual (*C.trachomatis*, *U.urealyticum*, *T.vaginalis*, *M.hominis* o *N.gonorrhoeae*) ha sido estudiada en numerosas ocasiones (McNeeley 1992; Soper 1994; Medvedev y col., 2008; Judlin y Thiebaugeorges, 2009; De Seta y col., 2012; Tsevat y col., 2017).

La infección por *C.trachomatis* puede ser asintomática hasta en el 80% de los casos (Cervantes, 2009), de forma que la mayoría de las mujeres que sufren de esterilidad tubárica no tienen antecedentes de EIP sintomática (Baraitser y col., 2011). En las trompas de Falopio, *C.trachomatis* es responsable tanto de daños en los cilios como de la obstrucción de las mismas, ya que la repuesta inmune a la *Chlamydia* produce cicatrización y fibrosis en el interior de las trompas lo que aumenta el riesgo de embarazos ectópicos y explicaría la esterilidad, reportándose que está asociada a 2/3 de los casos de esterilidad tubárica y a 1/3 de los embarazos ectópicos (Urbina y col. 2010). No

obstante, los factores asociados con la evasión de *Chlamydia* por los mecanismos de defensa inmune y la migración desde la parte inferior a la superior del tracto genital femenino, siguen no estando claramente explicados.

También *Ureaplasma spp* y *M.hominis* se han relacionado con daño tubárico, no tanto por su carácter patógeno como por la inflamación crónica y, en muchos casos asintomática, a que puede dar lugar su presencia en el tracto urogenital consecuencia de la que se liberan una serie de mediadores intercelulares y radicales oxidantes causantes del daño tisular en el aparato genital (Liu, 2014).

Zhou y col. al comparar mujeres con esterilidad tubárica y controles fértiles detectaron una prevalencia significativa ( $p < 0,05$ ) de *C.trachomatis* del 14,99%, *U.urealyticum* del 23,24% y 9,17%, para la coinfección por *C.trachomatis*, *U.urealyticum* y *M.hominis* (Zhou y col., 2011).

De las 28 mujeres con factor de esterilidad tubárico puro (20) o asociado a otros factores de esterilidad (8), 8 de sus parejas presentaron ITREM. Aunque no se demostró asociación entre el tener una ITREM y presentar esterilidad tubárica la pareja femenina, el riesgo casi se duplica.

Por otro lado, al analizar la esterilidad tubárica frente a la infección por *C.trachomatis* en el varón, tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa, no presentando esterilidad tubárica ninguna de las dos parejas femeninas de los dos hombres infectados por *C.trachomatis*. No obstante, el reducido número de casos no permite sacar conclusiones estadísticamente relevantes.

En lo que respecta a los micoplasmas, el análisis de esterilidad tubárica frente a la infección por *U.urealyticum/parvum* en la pareja masculina reveló que, aunque no hubo asociación, la probabilidad de presentar obstrucción de las trompas uterinas en la mujer fue más del doble que en los casos no infectados. Aunque el protocolo para la evaluación de la esterilidad puede variar entre una clínica y otra, en muchas clínicas de TRHA se incluye el cribado de todos estos microorganismos en el protocolo de estudio previo y, de acuerdo con los resultados presentados y la bibliografía existente sobre la relación entre infección y daño tubárico, especialmente en el caso de

*C.trachomatis*, debe considerarse aconsejable y potencialmente beneficioso el cribado previo de estos microorganismos.

Debe tenerse presente que, en relación con el factor tubárico, sería más efectivo el cribado de infección en la mujer que en la pareja masculina, aspecto que deberá tenerse en cuenta a la hora de diseñar el protocolo definitivo de estudio.

## 5.5 CUESTIONARIO NIH-CPSI E ITREM

Uno de los objetivos planteados en el presente estudio es la utilidad del cuestionario NIH-CPSI para detectar infección de ITREM y la posibilidad de que sustituya al cribado microbiológico. De acuerdo con los resultados obtenidos, el cuestionario no puede ser utilizado en sustitución del cribado microbiológico ya que no detectaría los casos de infección asintomática ni las colonizaciones cuya erradicación puede ser de gran interés como ya se ha comentado en apartados previos. Concretamente, habrían quedado excluidos un 14,7% de pacientes positivos en el estudio microbiológico.

## 5.6 FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO. DIRECTRICES FUTURAS.

Algunos autores consideran a *U.urealyticum* como comensal del tracto genital (Núñez 1999; Mayo y col. 2009) mientras otros como Imudia y col. encontraron una prevalencia del 20,1% de pacientes positivos para *U.urealyticum* durante la evaluación inicial de mujeres estériles, aunque existen algunas dudas de su papel en la esterilidad (Imudia y col., 2008). En el presente estudio se encontró una prevalencia para *U.urealyticum/parvum* en los hombres de mujeres estériles del 15,1 %.

Los resultados obtenidos por diversos estudios señalan que el papel de los micoplasmas genitales en la esterilidad humana todavía no está claro y requiere más investigaciones puesto que los resultados son controvertidos en cuanto a su papel patogénico (Zhang y col., 2014; Bachmann y col., 2015; Marovt y col., 2015; Cox y col., 2016; Horner y col., 2018;).



Es por ello que algunas investigaciones no recomiendan, durante la evaluación inicial de las parejas estériles, la detección rutinaria de los micoplasmas sin ninguna evidencia clínica, dado a que no es rentable debido a bajas tasas de detección (Imudia y *col.*, 2008; Günyeli y *col.*, 2011; Rosemond y *col.*, 2006). No obstante, la infección por este microorganismo puede reducir la tasa de éxito de las TRA, entre ellas la IIU, la FIV o la ICSI; asimismo, podría causar una marcada reducción del desarrollo embrionario temprano posterior a la FIV (Fenkci y *col.*, 2002). Estos aspectos no han sido estudiados en este trabajo. Si bien el tipo y diseño del mismo presenta algunas limitaciones para efectuar un análisis de causalidad directa y no excluye otros efectos que pudiesen explicar la fertilidad, los resultados del trabajo informan de una considerable prevalencia de estos patógenos en la muestra evaluada. Asimismo, el estudio tiene limitaciones para que los resultados sean generalizables, puesto que se realizó un muestreo intencionado, por tanto, sería recomendable continuar el mismo, incluyendo una mayor cantidad de hombres seleccionados mediante criterios más rigurosos aplicando técnicas de diagnóstico molecular en sus parejas.

La PCR múltiple en tiempo real es una herramienta diagnóstica rápida caracterizada por su alta sensibilidad y especificidad que permite la diferenciación de microorganismos de difícil y lenta recuperación en cultivo como son muchos de los presentes en el tracto urogenital (Sánchez y *col.*, 2009). Esto la convierte en una técnica imprescindible, no solo para el cribado de la colonización/infección sino, también, el control de la eficacia de los tratamientos.

El estudio realizado tiene diversas limitaciones, algunas de las cuales ya han sido insinuadas en el apartado de 5.1 de la discusión. El tamaño de la muestra (205 pacientes), pudiera haber condicionado el poder estadístico y con ello la obtención de resultados significativos, principalmente los eventos relacionados con los parámetros del seminograma y la esterilidad tubárica. Es posible que con una muestra considerablemente mayor se hubiera encontrado asociaciones estadísticamente más robustas con los resultados del análisis multivariado. No se ha planteado un grupo control para valorar si se puede dar una resolución espontánea de las infecciones/colonizaciones



detectadas, aunque podría valorarse en futuros estudios. Está claro que el tratamiento podría alterar la microbiota uretral/vaginal pero realmente lo que se pretendía con el mismo era eliminar de esa microbiota un microorganismo concreto y eso en teoría no es posible sin aplicar el tratamiento, aunque se deberá evaluar en futuros estudios si es posible el aclaramiento espontáneo de los microorganismos evaluados. Así, no se evaluó el aclaramiento espontáneo de los ureaplasmas/micoplasmas dado que lo que se pretendía era primero saber en nuestro entorno cual es el tratamiento más efectivo para eliminarlo de la microbiota vaginal de nuestras pacientes ya que lo que sí parece, es que su presencia puede tener consecuencias obstétricas posteriores. Además se evaluará en próximos estudios si el tratamiento para eliminar los ureaplasmas/micoplasmas altera la microbiota vaginal provocando disbiosis o incluso vaginosis bacteriana.

Sólo se han realizado algunos estudios y un metaanálisis (van Oostrum y col., 2013, no incluye los estudios posteriores de Mangot, Salah y Haahr) en mujeres estériles correlacionando la microbiota vaginal y los resultados posteriores en FIV. Algunos de estos estudios sugieren consecuencias negativas para la fecundidad femenina (Salah y col., 2013; Haahr y col., 2016) pero otros no (los 7 incluidos en el metaanálisis y el de Mangot-Bertrand y col., 2013). Sólo dos de ellos han utilizando PCR cuantitativa (qPCR) para el diagnóstico de una microbiota vaginal anormal en mujeres estériles (Mangot-Bertrand y col., 2013; Haahr y col., 2016). El estudio de Mangot y col. no encuentran afectación significativa mientras que el de Haahr y col. sí. Lo que realmente se pretendía conocer en el presente estudio era la prevalencia de *Ureaplasma* y *Mycoplasma* para en próximos estudios estudiar conjuntamente la presencia de estos microorganismos con la presencia o no de vaginosis bacteriana y sus implicaciones sobre los resultados en FIV y posibles abortos, así como la patología obstétrica.

Por otra parte, este estudio tiene diversas fortalezas, algunas de la cuales se citan a continuación. Se trata de un estudio prospectivo. La existencia de una historia clínica electrónica permite revisar de forma detallada y fiable la información. La disponibilidad, igualmente, de bases de datos específicas del seminograma y su estudio mediante

métodos semiautomatizados objetivos le da fortaleza a los resultados. Se han utilizado métodos moleculares para el estudio de los micoplasmas, clamidia y gonorrea, así como para el VPH. También contribuye a mejorar el conocimiento científico acerca del impacto de las distintas bacterias evaluadas sobre los parámetros seminales. Los resultados harán cambiar la práctica clínica de la URHA-CHUS en el estudio de las ITREM.

A partir de aquí, conociendo la prevalencia y dando el protocolo por válido, se pueden plantear estudios de impacto del tratamiento como valoración de si existe infección en la muestra del día de la TRHA, valorar si mejora la calidad del semen y disminuye la FDE tras el tratamiento, valorar si aumentan las tasas de embarazo y de nacido vivo tras la eliminación de la infección/colonización. Una vez que el hombre ha sido tratado y si el semen es apto para FIV convencional, valorar el % de contaminación del cultivo tras aplicación de FIV convencional. En caso de fallo de fecundación total, cultivar el medio de cultivo de los ovocitos para valorar si se ha debido a infección o a la interacción espermatozoide/ovocito.

## 6 CONCLUSIONES

1. *Ureaplasma spp* fue el microorganismo más frecuente en el tracto urogenital de los pacientes estudiados seguido de *M.hominis*, habitualmente en coinfección con *Ureaplasma spp*. Los valores de prevalencia calculados son lo suficientemente elevados como para justificar los beneficios de su cribado y tratamiento erradicador con la finalidad de conseguir la esterilidad del semen.
2. Azitromicina oral en dosis única de 1 g no es eficaz para la descolonización uretral de micoplasmas, especialmente en mujeres; siendo la doxiciclina 100 mg vía oral, dos veces al día durante siete días, el tratamiento de elección. Las quinolonas podrían ser una alternativa terapéutica eficaz para el tratamiento de los casos de persistencia si bien el número de casos es insuficiente para sacar conclusiones definitivas.
3. La baja prevalencia encontrada para *C.trachomatis* y del VPH podría cuestionar la realización de su cribado. No obstante, teniendo en cuenta los posibles efectos adversos asociados a su infección, tanto en la salud reproductora de ambos miembros de la pareja, como en la gestación y el neonato, su inclusión en el estudio previo de los pacientes de TRHA podría ser beneficiosa.
4. El mismo razonamiento que en el apartado anterior podría aplicarse al estudio de prostatitis mediante la técnica de Meares y Stamey modificada ya que no se encontró ningún caso positivo.
5. El tabaco es causa de menor calidad del semen reduciendo la movilidad de los espermatozoides.

6. La colonización/ITREM es causa de menor calidad del semen en lo que se refiere a viscosidad, movilidad, recuperado y morfología de los espermatozoides, pero no se ha encontrado relación con la leucocitospermia o presencia de PMN en semen.
7. La probabilidad de esterilidad tubarica en la pareja se duplica en los pacientes con resultado positivo en el cribado microbiológico.
8. El cuestionario NIH-CPSI no es útil como método de cribado para seleccionar los casos en los que se deba realizar estudio de prostatitis o colonización/ITREM.
9. El cribado y erradicación de microorganismos en el semen permite reducir notablemente el número de ICSI a favor de la FIV convencional.

A modo de resumen y como conclusión final, teniendo en cuenta:

- la alta prevalencia de micoplasmas genitales,
- los potenciales efectos adversos sobre la calidad del semen, la salud urogenital de ambos miembros de la pareja, la gestación y el recién nacido,
- el alto coste emocional y físico de los pacientes sometidos a TRHA,
- la potencial reducción de costes en relación con la técnica de fecundación utilizada,

está indicado incluir el cribado microbiológico del tracto urogenital masculino en los pacientes incluidos en TRHA. Además, dado que estas infecciones aumentan la posibilidad de consecuencias graves a largo plazo en las mujeres (enfermedad inflamatoria pélvica, daño tubárico, embarazo ectópico y esterilidad) y que su prevalencia se considera un buen marcador de prácticas de “sexo inseguro” y de riesgo de otras ITS, los resultados de este estudio apuntan hacia la necesidad de potenciar estrategias preventivas en el varón a nivel primario.

## 7 RESUMEN

El diagnóstico de la esterilidad masculina habitualmente se basa en el análisis del semen. Sin embargo, la ITREM es uno de los factores que pueden contribuir a dicha esterilidad pudiendo llegar a ser, en muchos casos, reversible con tratamiento antibiótico adecuado.

Las ITREM engloban las infecciones del tracto génito-urinario (balanitis, uretritis, prostatitis, epididimitis y orquitis) y de sus glándulas accesorias cuya etiología puede ser de naturaleza bacteriana, fúngica, parasitaria o viral. Pueden ser causa de esterilidad masculina hasta en un 15% de los casos y detectarse hasta en un 45% de los individuos con problemas de esterilidad.

El proceso infeccioso puede afectar a la fertilidad por diferentes mecanismos entre los que se incluye el deterioro de la espermatogénesis, la alteración de la función espermática por alteración de la motilidad y la morfología espermática, la obstrucción de conductos o la unión a los espermatozoides llegando, incluso, a inmovilizarlos o a dificultar su unión al ovocito penetrando en el interior del espermatozoide. Por otro lado, la infección se puede transmitir a la pareja femenina causando problemas graves de salud como la salpingitis crónica, con la consecuente esterilidad tubárica.

No obstante, la detección de bacterias en el eyaculado espermático (bacteriospermia) no siempre es indicativa de infección pudiendo deberse a la contaminación de la muestra, la colonización del tracto urogenital (bacteriospermia no patógena) o la ITREM (bacteriospermia patógena).

Hasta la fecha, los estudios publicados discrepan en cuanto a la relevancia del cribado microbiológico sistemático en el paciente estéril, al protocolo de estudio más adecuado, y a los criterios diagnósticos que atribuyan patogenicidad a la presencia de los microorganismos encontrados. Tampoco existe consenso en cuanto a la conveniencia del tratamiento antibiótico en los casos positivos.

El objetivo principal del presente estudio prospectivo fue determinar la conveniencia de incorporar el cribado microbiológico del semen de los pacientes incluidos en TRA así como, en caso afirmativo, establecer el protocolo más adecuado para ello, incluyendo las acciones a tomar en los casos positivos (eficacia del tratamiento antimicrobiano).

Con tal finalidad se establecieron otros objetivos secundarios tales como conocer la prevalencia de los principales microorganismos asociados a ITREM en la población incluida en el Programa de TRA del Área Sanitaria de Santiago, evaluar la validez del cuestionario NIH-CPSI como herramienta para el diagnóstico presuntivo de prostatitis, y analizar la relación existente entre presencia de microorganismos en el tracto urogenital masculino y los parámetros de calidad seminal así como con el factor femenino de esterilidad.

Tras aplicar los criterios de exclusión, participaron un total de 205 parejas del Área Sanitaria a la que da cobertura la URHA-CHUS para el estudio/tratamiento de esterilidad durante un año (diciembre de 2015 a diciembre de 2016) y que aceptaron participar en el mismo. Se aplicó un muestreo no probabilístico, consecutivo y voluntario.

El análisis microbiológico se realizó de acuerdo con los protocolos para estudio de prostatitis basados en cultivo convencional según la técnica de Meares y Stamey utilizándose la primera fracción de la orina (correspondiente a la uretra) para el cribado de micoplasmas genitales (*Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*) y *Chlamydia trachomatis* por técnicas moleculares basadas en PCR múltiple en tiempo real. El cribado de VPH (genotipos de alto riesgo), también por PCR en tiempo real se hizo en el semen.

Los participantes contestaron al cuestionario NIH-CPSI que explora los tres grandes dominios de la prostatitis: el dolor, las alteraciones miccionales y el impacto sobre la calidad de vida.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con SPSS v22.0 (IBM Corp. Armonk, NY: IBM Corp).

El rango de edad fue de 24 a 54 años en los hombres y de 23 a 39 en las mujeres con una mediana de 36 años en los hombres (rango intercuartílico = 33 a 39) y de 35 años en las mujeres (rango

intercuartílico = 32 a 38). La edad media de los hombres fue de 35,96 años y la mayoría estaban incluidos en la franja de edad de los 35 a los 44 años (60%). La edad media de las mujeres fue de 34,6 años y la mayoría estaban incluidas en la franja de edad de los 34 a los 39 años (64,9%). El grupo racial mayoritario de los hombres estaba constituido por la raza caucásica (201/205, 98%), siendo minoritarias la raza americana (2/205, 1%), gitana (1/205, 0,5%) y Romaní (1/205, 0,5%). Todos los participantes tuvieron una única pareja sexual en el último año, y ninguno de ellos tuvo serología positiva tanto para VIH, VHB, VHC y sífilis. Tampoco recibieron tratamiento antibiótico y/o en los 30 días previos a la toma de muestras. En cuanto a las ITS previas al estudio, ningún hombre contaba en su historial médico que las hubiera presentado, pero sí hubo 7 casos (3,4%) en los que la pareja tuvo alguna infección genitourinaria previa: 3 (1,5%) por VPH, 2 (1%) por *Streptococcus agalactiae* Grupo B, 1 (0,5%) por *Gardnerella vaginalis* y 1 (0,5%) por esta última asociada a *Candida*.

El tipo de esterilidad fue fundamentalmente primaria (189, 92,2%). La duración de la esterilidad media fue de 29,99 meses, con una mediana de 24 meses (rango intercuartílico = 18 a 36). El diagnóstico de esterilidad estuvo muy repartido entre el factor masculino (28,8%), femenino (27,3%), y de esterilidad de origen desconocido (EOD, 28,3%) siendo de causa de ambos miembros (mixta) en el 15,6% de los casos. Entre las causas de esterilidad en la mujer tenemos 23 (26,1%) con síndrome de ovario poliquístico (SOP), 20 (22,7%) con factor tubárico puro, 13 (14,8%) con endometriosis y 9 (10,2%) con fallo ovárico oculto (FOO). Por su parte entre las causas de esterilidad en el varón destacan 29 (31,9%) con astenozoospermia, 15 (16,5%) con oligoastenoteratozoospermia, 12 (13,2%) con oligoastenozoospermia, 9 (9,9%) con astenoteratozoospermia y 8 (8,8%) con oligozoospermia.

En cuanto al consumo de tóxicos la mayoría de los hombres son no fumadores (151, 73,7%) y sólo dos (1%) son consumidores habituales de alcohol.

El estudio microbiológico de prostatitis fue negativo en todos los casos con un 6,8% de muestras contaminadas en los que se recuperó microbiota epitelial no significativa,

En ninguna de las muestras se encontró infección fúngica o parásitos (*T.vaginalis*).

Del total de los 205 varones estudiados, 33 (16,1%) fueron positivos por RCP-TR para micoplasmas genitales: *Ureaplasma spp*, 31 (15,1%) y *M. hominis*, 8 (3,9 %) 6 de ellos (2,9%) en coinfección. No hubo ninguna muestra positiva para *M. genitalium*.

Azitromicina 1g en dosis única demostró una baja eficacia como tratamiento erradicador de la colonización por *Ureaplasma spp*. con una tasa de fracaso del 62,5% razón por la que fue sustituida por doxiciclina 100 mg/día 7 días via oral como tratamiento de primera elección. En este caso, la tasa de fracaso en la descolonización fue del 12,8%.

Se encontraron dos pacientes infectados por *C.trachomatis* (1 %) que fueron eficazmente tratados con doxiciclina. Esta infección puede afectar a cualquier localización del tracto urogenital tanto masculino como femenino persistiendo durante largos períodos de tiempo. Una de las consecuencias más graves de la infección inaparente y prolongada es su impacto sobre la fertilidad en ambos sexos. En el caso de los varones se asocia a azoospermia, altas tasas de FDE y pobre calidad espermática, acompañándose de disminución del volumen espermático. Además, la adhesión e internalización en los espermatozoides repercute en su movilidad y morfología. En el caso de las mujeres, las consecuencias pueden ser la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), la esterilidad y el embarazo ectópico y, en el recién nacido, la conjuntivitis folicular y la infección respiratoria. En el presente estudio, el número de casos de infección por *C.trachomatis* no fueron suficientes para evaluar su relación con los parámetros seminales.

Hubo tres casos (1,5%) en los que se detectó VPH en semen (genotipos de alto riesgo no 16-18). Sus correspondientes parejas fueron negativas. La infección por VPH se ha asociado con motilidad reducida del espermatozoide y astenozoospermia idiopática, hay significativamente más anticuerpos anti-espermatozoides y en estos casos la motilidad aún es más reducida, disminuye las tasas de fecundación, puede inhibir el desarrollo de embriones solo en el estadio de 2 células reduciendo la tasa de formación de blastocistos y, por tanto, repercutiendo negativamente en el resultado de las TRHA.



También puede tener efectos adversos sobre la gestación aumentando las de aborto. En el presente estudio los casos de infección por VPH en el semen no han sido suficientes para evaluar su relación con los parámetros seminales.

La presencia de leucocitospermia ( $> 1$  millón/mL de PMN) en el semen sólo se detectó en 9/205 (4,4%). De los 9 casos, sólo 2 (22,2%) fueron positivos para ITREM, concretamente para *U.urealyticum/parvum*, no existiendo una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de PMN en el eyaculado y la presencia de ITREM; aunque los hombres que tienen PMN en el eyaculado tienen 2 (OR: 2,02; IC95%: 0,92 –4,42) veces más riesgo de tener una ITREM que los hombres que no tienen PMN en su semen.

El tabaco sí que se mostró como variable de interacción en lo que se refiere a: porcentaje de espermatozoides PR (menor en fumadores), espermatozoides INM (mayor en fumadores), y la presencia o no de ITREM.

La ITREM se asocia de forma estadísticamente significativa con menor porcentaje de espermatozoides PR, mayor viscosidad seminal, la elongación de la cabeza (piriforme, delgada, afilada), microcefalia, acrosoma anormal y presencia de gota citoplasmática en conjunto (descritas todas ellas como frecuentes en las infecciones del TREM), así como la elongación de la cabeza espermática, microcefalia y presencia de gota citoplasmática por separado, y en el límite de la significación estadística con menor REM.

No se encontró asociación entre esterilidad tubárica e ITREM aunque el diagnóstico de infección duplica la probabilidad de encontrar obstrucción tubárica en la pareja (OR= 2,125, IC: 0,82-5,54).

El análisis de regresión lineal múltiple demostró que el mayor efecto en la predicción del porcentaje de espermatozoides PR es el asociado a la variable itrem con un 13,1%, mientras que la variable tabaco tiene un efecto del 12,4% siendo la relación entre % PR, ITREM y hábito tabáquico negativa. El mayor efecto en la predicción del porcentaje de espermatozoides inmóviles es el asociado a la variable itrem con un 13,2%, mientras que la variable tabaco tiene un efecto del 12,4% siendo la relación entre el % INM, ITREM y el hábito tabáquico positiva.

El cuestionario NIH-CPSI no fue útil como herramienta de predicción y cribado de posibles casos de prostatitis.

La incertidumbre sobre la esterilidad del semen aboca en numerosas ocasiones al uso de ICSI como técnica de fecundación en pacientes que podrían ser manejados con procedimientos de FIV convencional más económicos, reduciéndose el número de ICSI realizadas y, consecuentemente, el gasto sanitario. Este ahorro permitiría asumir el gasto correspondiente al cribado microbiológico que también podría incidir en la mejora de las tasas de embarazo, y reducción de complicaciones obstétricas y neonatales. Deben tenerse presentes otros costes derivados del fracaso de los tratamientos como consecuencia de la contaminación bacteriana de los cultivos de embriones humanos.

Así pues, debe recomendarse el cribado y tratamiento de micoplasmas genitales pero no la erradicación absoluta como objetivo final. Posiblemente, la implementación futura de técnicas moleculares que cuantifiquen la carga bacteriana permitirá diferenciar con mayor claridad entre los pacientes que deben ser tratados y los que no, así como la eficacia de los tratamientos y su repercusión clínica.

En conclusión, la prevalencia estimada de colonización/infección por micoplasmas genitales en la población a estudio justificaría el beneficio del cribado y posterior tratamiento de los casos positivos teniendo en cuenta los potenciales efectos adversos sobre, la calidad del semen, la salud urogenital de ambos miembros de la pareja, la gestación y el recién nacido, y la potencial reducción de costes en relación con la técnica de fecundación utilizada. El alto coste emocional y físico de los pacientes en TRHA también debe ser una razón de peso a la hora de considerar el uso de todos los medios disponibles para asegurar, en la medida de lo posible, el éxito final de todo el procedimiento.

**PALABRAS CLAVE:** esterilidad; infertilidad; análisis de semen; infección tracto reproductor; NIH-CPSI; tratamiento antibiótico; micoplasmas; *Mycoplasma hominis*; *Mycoplasma genitalium*; *Ureaplasma urealyticum*; *Ureaplasma parvum*; *Chlamydia trachomatis*; *papilomavirus*, granulocitos, Fecundación in Vitro; Técnicas Reproducción Asistida, prevención primaria.

## 8 SUMMARY

The diagnosis of male sterility is usually based on semen analysis. However, the Male Reproductive Tract Infection (MRTI) is one factor that can contribute to such sterility may become, in many cases, reversible with appropriate antibiotic therapy.

The MRTI encompass genitourinary tract infections (balanitis, urethritis, prostatitis, epididymitis and orchitis) and their accessory glands whose etiology may be bacterial in nature, fungal, parasitic or viral. They can cause male sterility up to 15% of cases and detected in up to 45% of individuals with sterility problems.

The infectious process can affect sterility by different mechanisms including impaired spermatogenesis, impaired sperm function by altered motility and sperm morphology is included, duct obstruction or binding to sperm reaching even to immobilize or hinder its binding to the oocyte penetrating inside the sperm. On the other hand, the infection can be transmitted to the female partner causing serious health problems such as chronic salpingitis, with subsequent tubal sterility.

However, the detection of bacteria in ejaculated sperm (bacteriospermia) is not always indicative of infection may be due to contamination of the sample, urogenital tract colonization (nonpathogenic bacteriospermia) or MRTI (pathogenic bacteriospermia).

To date, published studies differ as to the relevance systematic microbiological screening of the patient sterile, the most appropriate study protocol, and diagnostic criteria pathogenicity attributed to the presence of microorganisms found. Nor is there consensus convenience of antibiotic treatment in positive cases.

The main aim of this prospective study was to determine the advisability of incorporating semen microbiological screening of patients included in ART and, if so, establish the most appropriate for that protocol, including actions to take in positive cases (efficacy antimicrobial treatment).

To this end other secondary objectives such as the prevalence of the main microorganisms associated with MRTI in the population included in the ART Program Health Area of Santiago, assess the validity of the questionnaire NIH-CPSI as a tool for presumptive diagnosis was established prostatitis, and analyze the relationship between the presence of microorganisms in the urogenital tract and male semen quality parameters as well as female sterility factor.

After applying the exclusion criteria, involving a total of 205 couples the health area to which covers the Assisted Human Reproductive Unit of University Clinic Hospital of Santiago for the study sterility treatment for one year (December 2015 to December 2016) and agreed to participate in the same. a non-probabilistic consecutive and voluntary sampling was applied.

Microbiological testing was performed according to the protocols for study prostatitis based on conventional culture according to the technique of Meares and Stamey used the first fraction of urine (corresponding to the urethra) for screening genital mycoplasmas (*Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*) and *Chlamydia trachomatis* by molecular techniques based on real-time multiplex PCR. HPV screening (high-risk genotypes), also by real-time PCR was done in the semen.

They answered the NIH-CPSI questionnaire that explores the three major domains of prostatitis: pain, micturition disorders and the impact on quality of life.

Statistical analyzes were performed with SPSS v22.0 (IBM Corp. Armonk, NY: IBM Corp).

The age range was 24 to 54 years in men and 23-39 in women with a median of 36 years for men (interquartile range = 33-39) and 35 years for women (interquartile range = 32-38). The average age of men was 35.96 years and most were included in the age group of 35 to 44 years old (60%). The average age of women was 34.6 years and most were included in the age group of 34 to 39 years old (64.9%). The majority racial group of men was consisting of the Caucasian (201/205, 98%), and minor American race (2/205, 1%), gypsy (1/205, 0.5%) and Romani (1/205, 0.5%). All participants had a single sexual partner in the last year, and none of them had both positive serology

for HIV, HBV, HCV and syphilis. They also received antibiotic and / or 30 days prior to sampling treatment. As for the pre-study STI, no man had in your medical history that had presented, but there were 7 cases (3.4%) in which the couple had some previous genitourinary infection: 3 (1.5%) HPV, 2 (1%) by *Streptococcus agalactiae* group B, 1 (0.5%) by *Gardnerella vaginalis* and 1 (0.5%) by the latter associated with *Candida*.

The type of sterility was essentially primary (189, 92.2%). The average duration of infertility was 29.99 months, with a median of 24 months (interquartile range = 18 to 36). The diagnosis of infertility was very divided between male factor (28.8%), female (27.3%), and unexplained infertility (28.3%) being the cause of both members (mixed) 15.6% of cases. The causes of infertility in women, there are 23 (26.1%) with polycystic ovary syndrome (PCOS), 20 (22.7%) with pure tubal factor, 13 (14.8%) with endometriosis and 9 (10.2%) with hidden ovarian failure. Meanwhile among the causes of infertility in males stand 29 (31.9%) with astenozoospermia, 15 (16.5%) with oligoasthenoteratozoospermia, 12 (13.2%) with oligoasthenozoospermia, 9 (9.9%) with astenoteratozoospermia and 8 (8.8%) with oligozoospermia.

As for the consumption of toxic substances most men are not smokers (151, 73.7%) and only two (1%) are regular consumers of alcohol.

Prostatitis microbiological study was negative in all cases with 6.8% of contaminated samples in which no significant epithelial microbiota recovered.

In none of the samples was found fungal infection or parasites (*T. vaginalis*).

Of all 205 men studied, 33 (16.1%) were positive by RT-PCR for genital mycoplasmas: *Ureaplasma spp*, 31 (15.1%) and *M.hominis*, 8 (3.9%) 6 of them (2.9%) in coinfection. There was no sign for *M. genitalium* positive.

One gram azithromycin single dose showed low efficacy as eradication therapy of colonization *Ureaplasma spp*.with a failure rate of 62.5% reason it was replaced with doxycycline 100 mg /day/7 days orally as first choice. In this case, the failure rate in the decolonization was 12.8%.

Two patients were found infected by *C.trachomatis* (1%) that was effectively treated with doxycycline. This infection can affect any location urogenital tract both male and female and persist for long periods of time. One of the most serious consequences of prolonged and unapparent infection is its impact on fertility in both sexes. In the case of men is associated with azoospermia, high rates of sperm DNA fragmentation and poor sperm quality, accompanied by decreased sperm volume. In addition, the adhesion and internalization affects sperm mobility and morphology. For women, the consequences can be pelvic inflammatory disease (PID), infertility and ectopic pregnancy and in the newborn, follicular conjunctivitis and respiratory infection. In the present study, the number of cases of *C.trachomatis* infection were not enough to evaluate its relationship with semen parameters.

There were three cases (1.5%) in which HPV was detected in semen (not high risk genotypes 16-18). Corresponding pairs were negative. HPV infection is associated with reduced sperm motility and idiopathic asthenozoospermia, there are significantly more anti-sperm antibodies and in these cases motility is further reduced, decreased fertilization rates, may inhibit the development of embryos only in the stage 2 cells by reducing the rate of blastocyst formation and thus negatively impacting the result of ART. It can also have adverse effects on pregnancy increasing abortion rates. In the present study the cases of HPV infection in the semen have not been sufficient to evaluate its relationship with semen parameters.

The presence of leucocytospermia ( $> 1$  million / mL PMN) in semen was only detected in 9/205 (4.4%). Of the 9 cases, only 2 (22.2%) were positive for MRTI, specifically for *U.urealyticum/parvum*, not a statistically significant association exists between the presence of PMN in the ejaculate and the presence of MRTI; although men who have PMN in the ejaculate have 2 (OR: 2.02; 95% CI: 0.92 - 4.42) times more likely to have a MRTI than men who have no PMN in their semen.

The tobacco which showed itself as interaction variable in regards to: percentage of sperm PR (lower in smokers), sperm INM (higher in smokers), and the presence or not of MRTI.

The MRTI is associated with statistically significantly lower percentage of sperm PR, increased seminal viscosity, elongation of the head (pyriform, thin, sharp), microcephaly, abnormal acrosome and presence of cytoplasmic droplet together (described all as common in MRTI infections) as well as the elongation of the sperm head, microcephaly and presence of cytoplasmic droplet separately, and in the limit of statistical significance less REM.

No association was found between tubal sterility and MRTI although the diagnostic of infection doubles the probability of finding tubal obstruction partner (OR = 2.125, CI: 0.82 to 5.54).

The analysis of multiple linear regression showed that the major effect in predicting the percentage of sperm PR is associated with the variable mrti with 13.1%, while the tobacco variable has an effect of 12.4% and the relationship between % PR, MRTI and smoking, was negative. The greatest effect in predicting the percentage of motile spermatozoa is associated with the variable mrti with 13.2%, while the tobacco variable has an effect of 12.4% and the relationship between % INM, mrti and habit smoking, was positive.

Questionnaire NIH-CPSI was not useful as a predictive tool and screening of possible cases of prostatitis.

Uncertainty about the sterility of semen drives on numerous occasions as the use of ICSI like fertilization technique in patients that could be handled more economical procedures conventional IVF, reducing the number of ICSI performed and consequently health spending. These savings would afford the microbiological screening could also impact on improving pregnancy rates and reduced spending obstetric and neonatal complications. Other costs associated with treatment failure must be treated as a consequence of bacterial contamination cultures of human embryos.

So, it should be recommended screening and treatment of genital mycoplasmas but not the absolute eradication as the ultimate goal. Possibly, the future implementation of molecular techniques to quantify the bacterial load will differentiate more clearly between patients who should be treated and those without, and the effectiveness of treatments and their clinical impact.



In conclusion, the estimated colonization / infection by genital mycoplasmas in the population prevalence study justify the benefit of screening and subsequent treatment of positive cases taking into account the potential adverse effects on the quality of semen, urogenital health of both members the couple, gestation and newborn, and potential cost reduction in relation to fertilization technique used. The high emotional and physical cost of patients in ART should also be a compelling reason when considering the use of all available means to ensure, as far as possible, the ultimate success of the procedure.

**KEYWORDS:** sterility; infertility, male; infertility, female; semen analysis; reproductive tract infections; NIH-CPSI; antibacterial agents; *mycoplasma*, *Mycoplasma hominis*; *Mycoplasma genitalium*; *Ureaplasma urealyticum*; *Ureaplasma parvum*; *Chlamydia trachomatis*; *Human papillomavirus*; granulocytes; Fertilization in Vitro; Assisted Reproduction Techniques, , primary prevention.



## 9 RESUMO

O diagnóstico da esterilidade masculina habitualmente baséase na análise do semen. Con todo, a ITREM é un dos factores que poden contribuír a dita esterilidade podendo chegar a ser, en moitos casos, reversible con tratamento antibiótico adecuado.

As ITREM engloban as infeccións do tracto génito-urinario (balanitis, uretritis, prostatitis, epididimitis e orquitis) e dos seus glándulas accesorias cuxa etioloxía pode ser de natureza bacteriana, fúngica, parasitaria ou viral. Poden ser causa de esterilidade masculina ata nun 15% dos casos e detectarse ata nun 45% dos individuos con problemas de esterilidade.

O proceso infeccioso pode afectar á esterilidade por diferentes mecanismos entre os que se inclúe o deterioro da espermatogénesis, a alteración da función espermática por alteración da motilidade e a morfoloxía espermática, a obstrución de conductos ou a unión aos espermatozoides chegando, ata, a inmovilizalos ou a dificultar a súa unión ao ovocito penetrando no interior do espermatozoide. Doutra banda, a infección pódese transmitir á parella feminina causando problemas graves de saúde como a salpingitis crónica, coa consecuente esterilidade tubárica.

Con todo, a detección de bacterias no eyaculado espermático (bacteriospermia) non sempre é indicativa de infección podendo deberse á contaminación da mostra, a colonización do tracto urogenital (bacteriospermia non patóxena) ou a ITREM (bacteriospermia patóxena).

Ata a data, os estudos publicados discrepan en canto á relevancia do cribado microbiolóxico sistemático no paciente estéril, ao protocolo de estudo máis adecuado, e aos criterios diagnósticos que atribúan patogenicidade á presenza dos microorganismos atopados. Tampouco existe consenso en canto á conveniencia do tratamento antibiótico nos casos positivos.

O obxectivo principal do presente estudo prospectivo foi determinar a conveniencia de incorporar o cribado microbiolóxico do semen dos pacientes incluídos en TRA así como, en caso afirmativo, establecer o protocolo máis adecuado para iso, incluíndo as accións a tomar nos casos positivos (eficacia do tratamento antimicrobiano).

Con tal finalidade establecéronse outros obxectivos secundarios tales como coñecer a prevalencia dos principais microorganismos asociados a ITREM na poboación incluída no Programa de TRA do Área Sanitaria de Santiago, evaluar a validez do cuestionario NIH-CPSI como ferramenta para o diagnóstico presuntivo de prostatitis, e analizar a relación existente entre presenza de microorganismos no tracto urogenital masculino e os parámetros de calidade seminal así como co factor feminino de esterilidad.

Tras aplicar os criterios de exclusión, participaron un total de 205 parellas do Área Sanitaria á que dá cobertura a URHA-CHUS para o estudo/tratamento de esterilidad durante un ano (decembro de 2015 a decembro de 2016) e que aceptaron participar no mesmo. Aplicouse un muestreo non probabilístico, consecutivo e voluntario.

A análise microbiolóxica realizouse de acordo cos protocolos para estudo de prostatitis baseados en cultivo convencional segundo a técnica de Meares e Stamey utilizándose a primeira fracción de ouriña (correspondente á uretra) para o cribado de micoplasmas xenitais (*Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*) e *Chlamydia trachomatis* por técnicas moleculares baseadas en PCR múltiple en tempo real. O cribado de VPH (genotipos de alto risco), tamén por PCR en tempo real fíxose no semen.

Os participantes contestaron ao cuestionario NIH-CPSI que explora os tres grandes dominios da prostatitis: a dor, as alteracións miccionais e o impacto sobre a calidade de vida.

As análises estatísticas leváronse a cabo con SPSS v22.0 (IBM Corp. Armonk, NY: IBM Corp).

O rango de idade foi de 24 a 54 anos nos homes e de 23 a 39 nas mulleres cunha mediana de 36 anos nos homes (rango intercuartílico = 33 a 39) e de 35 anos nas mulleres (rango intercuartílico = 32 a 38). A idade media dos homes foi de 35,96 anos e a maioría estaban incluídos na franxa de idade dos 35 aos 44 anos (60%). A idade media

das mulleres foi de 34,6 anos e a maioría estaban incluídas na franxa de idade dos 34 aos 39 anos (64,9%). O grupo racial maioritario dos homes estaba constituído pola raza caucásica (201/205, 98%), sendo minoritarias a raza americana (2/205, 1%), xitana (1/205, 0,5%) e Romaní (1/205, 0,5%). Todos os participantes tiveron unha única parella sexual no último ano, e ningún deles tivo seroloxía positiva tanto para VIH, VHB, VHC e sífilis. Tampouco recibiron tratamento antibiótico e/ou nos 30 días previos a tomaa de mostras. En canto ás ITS previas ao estudo, ningún home contaba no seu historial médico que as presentou, pero si houbo 7 casos (3,4%) nos que a parella tivo algunha infección xénitourinaria previa: 3 (1,5%) por VPH, 2 (1%) por *Streptococcus agalactiae* Grupo B, 1 (0,5%) por *Gardnerella vaginalis* e 1 (0,5%) por esta última asociada a *Candida*.

O tipo de esterilidade foi fundamentalmente primaria (189, 92,2%). A duración da esterilidade media foi de 29,99 meses, cunha mediana de 24 meses (rango intercuartílico = 18 a 36). O diagnóstico de esterilidade estivo moi repartido entre o factor masculino (28,8%), feminino (27,3%), e de esterilidade de orixe descoñecida (EOD, 28,3%) sendo de causa de ambos membros (mixta) no 15,6% dos casos. Entre as causas de esterilidade na muller temos 23 (26,1%) con síndrome de ovario poliquístico (SOP), 20 (22,7%) con factor tubárico puro, 13 (14,8%) con endometriosis e 9 (10,2%) con fallo ovárico oculto (FOO). Pola súa banda entre as causas de esterilidade no varón destacan 29 (31,9%) con astenozoospermia, 15 (16,5%) con oligoastenoteratozoospermia, 12 (13,2%) con oligoastenozoospermia, 9 (9,9%) con astenoteratozoospermia e 8 (8,8%) con oligozoospermia.

En canto ao consumo de tóxicos a maioría dos homes son non fumadores (151, 73,7%) e só dous (1%) son consumidores habituais de alcohol.

O estudo microbiolóxico de prostatitis foi negativo en todos os casos cun 6,8% de mostras contaminadas nos que se recuperou microbiota epitelial non significativa,

En ningunha das mostras atopouse infección fúngica ou parásitos (*T.vaginalis*).

Do total dos 205 varóns estudados, 33 (16,1%) foron positivos por PCR-RT para micoplasmas genitais: *Ureaplasma spp*, 31

(15,1%) e esterilidade, 8 (3,9 %) 6 deles (2,9%) en coinfección. Non houbo ningunha mostra positiva para *M. genitalium*.

Azitromicina 1g en dose única demostrou unha baixa eficacia como tratamento erradicador da colonización por *Ureaplasma spp.* cunha taxa de fracaso do 62,5% razón pola que foi substituída por doxiciclina 100 mg/día 7 días vía oral como tratamento de primeira elección. Neste caso, a taxa de fracaso na descolonización foi do 12,8%.

Atopáronse dous pacientes infectados por *C.trachomatis* (1 %) que fuerron eficazmente tratados con doxiciclina. Esta infección pode afectar a calquera localización do tracto urogenital tanto masculino como feminino persistindo durante longos períodos de tempo. Unha das consecuencias máis graves da infección inaparente e prolongada é o seu impacto sobre a esterilidade en ambos sexos. No caso dos varóns asóciase a azoospermia, altas taxas de FDE e pobre calidade espermática, acompañándose de diminución do volume espermático. Ademais, a adhesión e internalización nos espermatozoides repercute na súa mobilidade e morfoloxía. No caso das mulleres, as consecuencias poden ser a enfermidade inflamatoria pélvica (EIP), a esterilidade e o embarazo ectópico e, no recentemente nado, a conjuntivitis folicular e a infección respiratoria. No presente estudo, o número de casos de infección por *C.trachomatis* non foron suficientes para avaliar a súa relación cos parámetros seminais.

Houbo tres casos (1,5%) nos que se detectou HPV en semen (genotipos de alto risco non 16-18). As súas correspondentes parellas foron negativas. A infección por HPV asociouse con motilidade reducida do espermatozoide e astenozoospermia idiopática, hai significativamente máis anticorpos anti-espermatozoides e nestes casos a motilidade aínda é máis reducida, diminúe as taxas de fecundación, pode inhibir o desenvolvemento de embriones só no estadio de 2 células reducindo a taxa de formación de blastocistos e, xa que logo, repercutindo negativamente no resultado das TRHA. Tamén pode ter efectos adversos sobre a xestación aumentando as de aborto. No presente estudo os casos de infección por HPV no semen non foron suficientes para avaliar a súa relación cos parámetros seminais.

A presenza de leucocitospermia ( $> 1$  millón/mL de PMN) no semen só se detectou en 9/205 (4,4%). Dos 9 casos, só 2 (22,2%) foron positivos para ITREM, concretamente para *Urealyticum urealyticum/parvum*, non existindo unha asociación estadísticamente significativa entre a presenza de PMN no eyaculado e a presenza de ITREM; aínda que os homes que teñen PMN no eyaculado teñen 2 (OR: 2,02; IC95%: 0,92 ?4,42) veces máis risco de ter unha ITREM que os homes que non teñen PMN no seu semen.

O tabaco si que se mostrou como variable de interacción no que se refire a: porcentaxe de espermatozoides PR (menor en fumadores), espermatozoides INM (maior en fumadores), e a presenza ou non de ITREM.

A ITREM asóciase de forma estadísticamente significativa con menor porcentaxe de espermatozoides PR, maior viscosidad seminal, a elongación da cabeza (piriforme, delgada, afiada), microcefalia, acrosoma anormal e presenza de pinga citoplasmática en conxunto (descritas todas elas como frecuentes nas infeccións do TREM), así como a elongación da cabeza espermática, microcefalia e presenza de pinga citoplasmática por separado, e no límite da significación estatística con menor REM.

Non se atopou asociación entre esterilidade tubárica e ITREM aínda que o disgnóstico de infección duplica a probabilidade de atopar obstrucción tubárica na parella (OR= 2,125, IC: 0,82-5,54).

A análise de regresión lineal múltiple demostrou que o maior efecto na predicción da porcentaxe de espermatozoides PR é o asociado á variable itrem cun 13,1%, mentres que a variable tabaco ten un efecto do 12,4% sendo a relación entre % PR, ITREM e hábito tabáquico negativa. O maior efecto na predicción da porcentaxe de espermatozoides inmóbiles é o asociado á variable itrem cun 13,2%, mentres que a variable tabaco ten un efecto do 12,4% sendo a relación entre a % INM, ITREM e o hábito tabáquico positiva.

O cuestionario NIH-CPSI non foi útil como ferramenta de predicción e cribado de posibles casos de prostatitis.

A incerteza sobre a esterilidade do semen aboca en numerosas ocasións ao uso de ICSI como técnica de fecundación en pacientes que poderían ser manexados con procedementos de FIV convencional

máis económicos, reducíndose o número de ICSI realizadas e, consecuentemente, o gasto sanitario. Este aforro permitiría asumir o gasto correspondente ao cribado microbiolóxico que tamén podería incidir en mellóraa das taxas de embarazo, e redución de complicacións obstétricas e neonatales. Deben terse presentes outros custos derivados do fracaso dos tratamentos como consecuencia da contaminación bacteriana dos cultivos de embriones humanos.

Así pois, debe recomendarse o cribado e tratamento de micoplasmas xenitais pero non a erradicación absoluta como obxectivo final. Posiblemente, a implementación futura de técnicas moleculares que cuantifiquen a carga bacteriana permitirá diferenciar con maior claridade entre os pacientes que deben ser tratados e os que non, así como a eficacia dos tratamentos e a súa repercusión clínica.

En conclusión, a prevalencia estimada de colonización/infección por micoplasmas xenitais na poboación a estudo xustificaría o beneficio do cribado e posterior tratamento dos casos positivos tendo en conta os potenciais efectos adversos sobre, a calidade do semen, a saúde urogenital de ambos membros da parella, a gestación e o recentemente nado, e a potencial redución de custos en relación coa técnica de fecundación utilizada. O alto custo emocional e físico dos pacientes en TRHA tamén debe ser unha razón de peso á hora de considerar o uso de todos os medios dispoñibles para asegurar, na medida do posible, o éxito final de todo o procedemento.

**PALABRAS CRAVE:** esterilidade; infertilidade; análise de seme; infección tracto reprodutor; NIH-CPSI; tratamento antibiótico; micoplasmas; *Mycoplasma hominis*; *Mycoplasma genitalium*; *Ureaplasma urealyticum*; *Ureaplasma parvum*; *Chlamydia trachomatis*; papilomavirus, granulocitos, Fecundación in vitro; Técnicas Reprodución Asistida, prevención primaria.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

### A

- Abdel Monem MO, Saad AS, Saher A, Eissa and EI-DougDoug K.A. (2013). Potency of bacteriospermia and sperm quality in leukocytospermic infertile males. *Life Science Journal* 10: 1413-1418.
- Acosta-Boga B, Codina Grau MG, Matas Andreu L, Meseguer Peinado MA (2011) Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. *Procedimientos en Microbiología Clínica* Cap 40. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 14; 727-733.
- Ajello, L., L.K. Georg, W. Kaplan, and L. Kaufman. 1963. CDC laboratory manual for medical mycology. PHS Publication No. 994, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Alcoba J, Gutiérrez-González I, Batista N, García-Nieto V. (2004). Infección urinaria por *Haemophilus influenzae* como manifestación inicial de alteración renal. *Enferm Infecc Microbiol Clin* Feb;22(2):125-6.
- Al-Mously N, Cross NA, Eley A, Pacey AA. (2009). Real-time polymerase chain reaction shows that density centrifugation does not always remove *Chlamydia trachomatis* from human semen. *Fertil Steril* 92; 1606-1615.
- Alvarez JG. (2005). 'Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular sperm'. *Jul;20(7):2031-2; author reply 2032-3.*



- American Cancer Society, Inc., 2014. What are the risk factors for prostate cancer?. [Online] Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html> [Acceso 30/04/2018].
- Andrade-Rocha FT. (2001). Sperm parameters in men with suspected infertility. Sperm characteristics, strict criteria sperm morphology analysis and hypoosmotic swelling test. *J Reprod Med Jun*;46(6):577-82.
- Andrews WW, Goldenberg RL, Mercer B, Iams J, Meis P, Moawad A, et al. (2000). The preterm prediction study: association of second-trimester genitourinary chlamydia infection with subsequent spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 183(3):662–668. Arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation. 2010. JORF n°0211 du 11 septembre 2010 page 16522 ([http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=E5208A3073FE6E859E8337E72E28D0.tpdjo02v\\_3?cidTexte=LEGITEXT000018832366&dateTexte=20110710](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=E5208A3073FE6E859E8337E72E28D0.tpdjo02v_3?cidTexte=LEGITEXT000018832366&dateTexte=20110710)).
- Aruoma OI and Halliwell B. (1988). The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica* 18,459–470.
- Asare-Anane H, Bannison SB, Ofori EK, Ateko RO, Bawah AT, Amanquah SD, Oppong SY, Gandau BB, Ziem JB. (2016). Tobacco smoking is associated with decreased semen quality. *Reprod Health Aug* 5;13(1):90.
- Asenjo A, Kusters JG, Severs TT, Alós JI. (2018). *Mycoplasma genitalium* in Spain: prevalence of genital infection and frequency of resistance to macrolides. *Enferm Infecc Microbiol Clin Mar*;36(3):169-171.
- Askienazy-Elbhar M. Male genital tract infection: the point of view of the bacteriologist. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33; 691-697.
- Auroux MR, Jacques L, Mathieu D, Auer J. (1991). Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm



- motility: an in-vitro study in man with *Escherichia coli*. *Int J Androl* 1991; 14; 264-270.
- Aus G, Ahlgren G, Bergdahl S, Hugosson J. (1996). Infection after transrectal core biopsies of the prostate--risk factors and antibiotic prophylaxis. *Br J Urol*. Jun;77(6):851-5.
- Aydogan P, Kahyaoglu S, Saygan S, Kaymak O, Mollamahmutoglu L, Danisman N. (2014). Does cervical ureaplasma/mycoplasma colonization increase the lower uterine segment bleeding risk during cesarean section among patients with placenta previa? A cross-sectional study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* Aug;18(16):2243-7.
- Aynaud O, Poveda JD, Huynh B, Guillemotonia A, Barrasso R. (2002). Frequency of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen. *Int J STD AIDS* 2002 Aug;13(8): 547-50.
- Aznar Martín J, Blanco Galán MA, Lepe Jiménez JA, Otero Guerra L, Vázquez Valdés F. (2007) Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. *Procedimientos en Microbiología Clínica* Cap 24. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

## B

- Bachmann LH, Manhart LE, Martin DH, Seña AC, Dimitrakoff J, Jensen JS, Gaydos CA. (2015). Advances in the Understanding and Treatment of Male Urethritis. *Clin Infect Dis* Dec 15;61 Suppl 8:S763-9.
- Balmelli T, Stamm J, Dolina-Giudici M, Peduzzi R, Piffaretti-Yanez A, Balerna M. (1994). *Bacteroides ureolyticus* in men consulting for infertility. *Andrologia* Jan-Feb;26(1):35-8.
- Baraitser P, Alexander S, Sheringham J. (2011). Chlamydia trachomatis screening in young women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 23:315-20.
- Bar-Chama N, Fisch H. (1993). Infection and pyospermia in male infertility. *World J Urol* 11, 76-81.

- Bayasgalan G, Naranbat D, Radnaabazar J, Lhagvasuren T, Rowe PJ. (2004). Male infertility: risk factors in Mongolian men. *Asian J Androl* 6: 305-11.
- Bébéar CM, de Barbeyrac B, Pereyre S, Bébéar C. Mycoplasmes et chlamydiae: sensibilité et résistance aux antibiotiques. *Rev Fr Lab* 2007: 392; 77-85.
- Bébéar C, Cazanave C, Pereyre S, Bébéar MC. Mycoplasmes urogénitaux. In: Janier M (eds) *Les maladies sexuellement transmissibles*. 2009. Masson, Paris, France, pp 57-61.
- Becker HC, Weidner W, Schiefer HG, Brunner H, Krause W. (1984). Epididymitis. *Dtsch Med Wschr* 109; 569-575.979).
- Beeton ML, Chalker VJ, Jones LC, Maxwell NC, Spiller OB. (2015). Antibiotic Resistance among Clinical Ureaplasma Isolates Recovered from Neonates in England and Wales between 2007 and 2013. *Antimicrob Agents Chemother* Oct 12;60(1):52-6.
- Beeton ML, Spiller OB. (2017). Antibiotic resistance among Ureaplasma spp. isolates: cause for concern? *J Antimicrob Chemother* Feb;72(2):330-337.
- Ben-Chetrit A, Shen O, Haran E, Brooks B, Geva-Eldar T, Margalioth EJ. Transfer of embryos from yeast-colonized dishes. *Fertil Steril* 1996; 66:335-337.
- Berger RE, Alexander RE, Harnisch JP, Paulsen CA, Monda GD, Ansell J, Holmes KK. (1979). Etiology, manifestations and therapy of acute epididymitis: prospective study of 50 cases. *J Urol* 121; 750-754.
- Berger RE. Epididymitis. In: Holmes KK, Mardh P-A, Sparling PF, Wiesner PJ (eds) *Sexually transmitted diseases*. 1984. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 650-662.
- Berger RE, Krieger JN, Rothman I, Muller CH, Hillier SL. (1997). Bacteria in the prostate tissue of men with idiopathic prostatic inflammation. *J Urol* 157; 863-865.
- Berry WR, Gottesfeld RL, Alter HJ, Vierling JM. (1987). Transmission of hepatitis B virus by artificial insemination. *JAMA* 257: 1079-81.

- Bezold G1, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. (2007). Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* May;87(5):1087-97.
- Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsagué X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M & de Sanjosé S (2013) Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 30, H1–H31.
- Brewer, J.H. (1940). A clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobes. *J Bacteriol.* 39:10.
- Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. (2007). Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* 87; 1087-1097.
- Blas MM, Canchihuaman FA, Alva IE, Hawes SE. (2007). Pregnancy outcomes in women infected with *Chlamydia trachomatis*: a population-based cohort study in Washington State. *Sex Transm Infect* 83(4):314–318.
- Boucher P, Lejeune H, Pinatel MC, Gille Y. (1995). Spermoculture: improvement of the bacteriological quality of samples by direct verbal counselling before semen collection. *Fertil Steril* 1995; 64; 657-660.
- Burrello N, Salmeri M, Perdichizzi A, Bellanca S, Pettinato G, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. *Candida albicans* experimental infection: effects on human sperm motility, mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Reprod Biomed Online* 2009; 18; 496-501.
- Busolo F, Zanchetta R, Bertoloni G. (1984). Mycoplasmic localization patterns on spermatozoa from infertile men. *Fertil Steril* 42; 412-7.

C

- Capoccia R, Greub G, Baud D. (2013). *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis* Jun;26(3):231-40.
- Carne CA, Chilcott S, Palmer C, Green O, Bridge S, Walsh R, Gramy-Mason A, O'Donovan M. (2012). Low sperm counts in genitourinary medicine clinic attendees: results from a case-control study. *Sex Transm Infect* Oct;88(6):422-6.
- Carpenter, C.M., and H.E. Morton. (1947). An improved medium for isolation of the gonococcus in 24 hours. *Proc. N.Y. State Assoc. Public Health Labs* 27:58-60.
- Carpenter, C.M., M.A. Bucca, T.C. Buck, E.P. Casman, C.W. Christensen, E. Crowe, R. Drew, J. Hill, C.E. Lankford, H.E. Morton, L.R. Peizer, C.I. Shaw, and J.D. Thayer. (1949). Evaluation of twelve media for the isolation of the gonococcus. *Am. J. Syphil. Gonorrh. Venereal Diseases* 33:164-176.
- Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. (1993). *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* Jan;6(1):69-87.
- CDC-Center of Diseases Control and Prevention. Guideline for Environmental Infection Control in HealthCare Facilities: Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR*. 2003: 52(RR-10):1-48.
- Cervantes E. (2009). Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*. *Rev Fac Med UNAM* 52:18-22.
- Cervical cancer screening and prevention. Practice Bulletin No. 168. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2016;128:e111–30.
- Chan PJ, Seraj IM, Kalugdan TH, King A. (1996). Evidence for ease of transmission of human papillomavirus DNA from sperm to cells of the uterus and embryo. *J Assist Reprod Genet* 13:516–519.

- Christiansen E, Tollefsrud A and Purvis K. (1991). Sperm quality in men with chronic abacterial prostatovesiculitis verified by rectal ultrasonography. *Urology* 38; 545-549.
- Choi JB, Lee SJ, Lee MK, Lee SJ, Park DC, Kim HY, Lee DS, Choe HS. (2018). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* in Asymptomatic Individuals in Korea. *Microb Drug Resist* Nov;24(9):1391-1396.
- Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Pinto V, Marinaccio M, Indraccolo U, De Ziegler D, Resta L. (2014). Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci* May;21(5):640-7.
- Cintron RD, Wortham JW Jr, Acosta A. (1981). The association of semen factors with the recovery of *Ureaplasma urealyticum*. *Fertil Steril* 36:648-52.
- Clemens JQ, Meenan RT, O'Keeffe Rosetti MC, Gao SY, Calhoun EA. (2005b). Incidence and clinical characteristics of National Institutes of Health type III prostatitis in the community. *J Urol* Dec;174(6):2319-22.
- Clemens JQ, Meenan RT, O'Keeffe Rosetti MC, Kimes T, Calhoun EA. (2007). Prevalence of and risk factors for prostatitis: population based assessment using physician assigned diagnoses. *J Urol* 178; 1333-1337.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; 88:63-73.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-sixth Informational Supplement. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: Clinical and laboratory Standards Institute; 2016.
- Comhaire F, Verschraegen G & Vermeulen L. (1980). Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. *Int J Androl* 3, 32-45.

- Comhaire, FH & MA, MA. (2007). Male tract infections: diagnosis and treatment. In: Oehninger S C, Kruger T F: Male infertility. Diagnosis and treatment. s.l.:Informa UK Ltd.
- Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Virus del papiloma humano. Manual de vacunas en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP; abr/2018. [consultado el 12/05/2018]. Disponible en: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-42>
- Conselleria de Sanidade. Viernes Epidemiológico. Vol 3, Nº 8 de 11 de abril de 2014.
- Cooper TG, Weidner W and Nieschlag E. (1990). The influence of inflammation of the human genital tract on secretion of the seminal markers alpha glucosidase, glyceryl-phosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl* 13; 329-336.
- Cottell E, J McMorow, Lennon B, Fawzy M, M Cafferkey, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril* 1996; 66(5): 776-780.
- Cottell E, Lennon B, McMorow J, Barry-Kinsella C, Harrison RF. (1997). Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 67:98-103.
- Courcol R. Référentiel en microbiologie médicale, Société Française de Microbiologie. 4th edn, 2010. Rémic, Paris, France.
- Cunningham KA, Beagley, KW. (2008). Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Reprod* 2008; 79; 180-189.
- Cox C, McKenna JP, Watt AP, Coyle PV. (2016). *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium* are found to be significantly associated with microscopy-confirmed urethritis in a routine genitourinary medicine setting. *Int J STD AIDS* Sep;27(10):861-7.
- Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 119:1095-1101.

**D**

- Daxboeck F, Zitta S, Stadler M, Iro E, Krause R. (2005). *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sterile pyuria. *J Infect* Jul;51(1):54-8.
- De Barbeyrac B, Clerc M, Peuchant O, Bébéar C. *Chlamydia trachomatis*. In: Janier M (eds) *Les maladies sexuellement transmissibles*. 2009. Masson, Paris, France, pp 46-56.
- Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975; la 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983; la 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989; la 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996; la 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000; la Nota de Clarificación, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002; la Nota de Clarificación, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004; la 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008; la 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, Octubre 2013.
- DECRETO 29/2009, de 5 de febrero, por el que se regula el uso y acceso a la historia clínica electrónica. *Diario Oficial de Galicia*.
- De Francesco MA, Negrini R, Ravizzola G, Galli P, Manca N. (2011). Bacterial species present in the lower male genital tract: a five-year retrospective study. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 16; 47-53.
- Deguchi T, Shimada Y, Horie K, Mizutani K, Seike K, Tsuchiya T, Yokoi S, Yasuda M, Ito S. (2015). Bacterial loads of *Ureaplasma parvum* contribute to the development of inflammatory responses in the male urethra. *Int J STD AIDS* Dec;26(14):1035-9.
- Depuydt CE, Verstraete L, Berth M, Beert J, Bogers JP, Salembier G, Vereecken AJ, Bosmans E. (2016). Human Papillomavirus Positivity in Women Undergoing Intrauterine Insemination Has



- a Negative Effect on Pregnancy Rates. *Gynecol Obstet Invest* 81: 41-6.
- Diemer TH and Desjardins C. Disorders of spermatogenesis. In Knobil E and Neill JD (eds) *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 4. 1999. Academic Press, San Diego, USA, pp.546-556.
- Diemer T, Huwe P, Ludwig M, Hauck EW, Weidner W. (2003). Urogenital infection and sperm motility. *Andrologia* 35; 283-287.
- Dieterle S. (2008). Urogenital infections in reproductive medicine. *Andrologia* 40; 117-119.
- Dirección General de Salud Pública. Informe VIH-sida en Galicia 2017 [monografía en internet]. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia, Consellería de Sanidad; 2017. Disponible en: <http://www.sergas.es/saudepublica/informes-epidemiologicos-de-vih-sida>.
- Dolivo M, Askienazy-Elbhar M. (1993). Value of prostatic massage for detection of *Chlamydia trachomatis* in the male urethra. *Contracept Fertil Sex* Jan;21(1):41-4
- Domes T, Lo KC, Grober ED, Mullen JBM, Mazzulli T, Jari K. (2012). The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertil Steril* 2012; 97; 1050-1055.
- Domingues D, Nogueira F, Tavira L, Exposto F. (2005). Mycoplasmas: what is the role in human infections?. *Acta Med Port* Sep-Oct;18(5):377-83.
- Donders GG, Ruban K, Bellen G, Petricevic L. (2017). Mycoplasma/Ureaplasma infection in pregnancy: to screen or not to screen. *J Perinat Med* Jan 18; 1-11.
- Dowell, V.R., Jr., G.L. Lombard, F.S. Thompson, and A.Y. Armfield. (1977). Media for isolation, characterization, and identification of obligately anaerobic bacteria. *CDC laboratory manual*. Center for Disease Control, Atlanta.
- Dowell, V.R., Jr., and T.M. Hawkins. 1987. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. *CDC laboratory manual*. HHS



Publication No. (CDC) 87-8272. Centers for Disease Control, Atlanta.

DXSP. Prevalencia de VPH de alto risco nas mulleres galegas. Boletín Epidemiolóxico de Galicia 2012; vol. XXIV, nº 2.

DXSP. Ingresos e mortalidade por cancro de cervix en galicia: 1996-2013. Boletín Epidemiolóxico de Galicia 2015; vol. XXVII, nº 2.

DXSP. Efectividade da vacinación fronte o vph en galicia: 2014-2017. Boletín Epidemiolóxico de Galicia 2017; vol. XXIX, nº 6.

## E

Edwards SK, Bunker CB, Ziller F, van der Meijden WI. (2013). 2013 European guideline for the management of balanoposthitis. Int J STD AIDS Aug;25(9):615-26.

## F

Falk L, Fredlund H, Jensen JS. (2003). Tetracycline treatment does not eradicate Mycoplasma genitalium. Sex Transm Infect Aug;79(4):318-9.

Feinberg, j.g. and M.J. Whittington. (1957). A culture for Trichomonas vaginalis Donne and species of Candida. J. Clin.Pathol., 10:32.

Fenkci V, Yilmazer M, Aktepe OC. (2002). Have Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections any significant effect on female fertility? Infez Med 10:220-3.

Finegold, S.M., V.L. Sutter, H.R. Attebery, and J.E. Rosenblatt. 1974. Isolation of anaerobic bacteria, p. 368. In E.H. Lennette, E.H. Spaulding, and J.P. Truant (ed.), Manual of clinical microbiology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Fode M, Fusco F, Lipshultz L, Weidner W.

Sexually Transmitted Disease and Male Infertility: A Systematic Review. (2016). Eur Urol Focus Oct;2(4):383-393.

- Forbes, B.A., and P.A. Granato. (1995). Processing specimens for bacteria, p. 265-281. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G. (2008). Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril* 93: 802-6.
- Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G, Garolla A. (2010). Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 94: 1723-7.
- Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, Ferlin A. (2011a). Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One* 2011 Mar 7;6(3): 1-9.
- Foresta C, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Garolla A. (2011b). Semen washing procedures do not eliminate human papilloma virus sperm infection in infertile patients. *Fertil Steril* 96: 1077-82.
- Foresta C, Noventa M, De Toni L, Gizzo S, Garolla A. (2015). HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology* Mar;3(2):163-73.
- Fraczek M, Kurpisz M. (2007a). Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl* 28; 325-333.
- Fraczek M, Szumala-Kakol A, Jedrzejczak P, Kamieniczna M, Kurpisz M. (2007b). Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in vitro model of semen inflammation. *Fertil Steril* 88; 1076-1085.

## G

- Galán JC, Alonso R, Gutiérrez J, Rodríguez-Domínguez M, Salinas J, Sanbonmatsu S. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. En: Cantón R, Cercenado E, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2.a ed. (44), 2012 [consultado Mayo 2018]. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap44indice.htm>
- Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes, V, Gosálvez J, Fernández JL. (2008). Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertil Steril* 90; 328–334.
- García Martos P, Hernández del barrio MT, Paredes Salido F. Microscopia de las bacterias. En: *Microbiología Clínica Práctica*. 1997. Servicio de publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz, España, pp 33-34.
- Garolla A, Pizzol D, Foresta C. The role of human papillomavirus on sperm function. (2011). *Curr Opin Obstet Gynecol* Aug;23(4):232-7.
- Garolla A, Lenzi A, Palù G, Pizzol D, Bertoldo A, De Toni L, Foresta C. (2012). Human papillomavirus sperm infection and assisted reproduction: a dangerous hazard with a possible safe solution. *Hum Reprod* Apr 27(4):967-73.
- Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, De Toni L, Barzon L, Foresta C. (2013). Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil Steril* Jan;99(1):125-31.
- Garolla A, Engl B, Pizzol D, Ghezzi M, Bertoldo A, Bottacin A, Noventa M, Foresta C. (2016). Spontaneous fertility and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection. *Fertil Steril* Jan;105(1):65-72.

- Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami A. (2007). *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect Dis* Nov 8;7: 129.
- Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, Chakroun N, Sellemi A, Znazen A, Rebai T, Hammami A. (2008). Assessment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, and *Mycoplasma genitalium* in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 29; 198–206.
- Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters JR, Meredith J, Stacey GN, Thraves P, Vias M. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* Sep 9;111(6):1021-46.
- Gerbase, A., Rowley J.T., and Mertens, T.E. (1998). Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 351:(S3) 2-4.
- Giamarellou H, Tympanidis K, Bitos NA, Leonidas E, Daikos GK. (1984). Infertility and chronic prostatitis. *Andrologia* 16; 417-422.
- Gibbons, R.J. and J.B. MacDonald. (1960). Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol* 80:164-170.
- Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Agarwal A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 16; 1922-1930.
- Giuliano AR, Lee JH, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Salmeron J, Anic GM, Rollison DE, Smith D. (2011). Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet* 377: 932-40.
- Golshani M, Taheri S, Eslami G, Suleimani Rahbar AA, Fallah F, Goudarzi H. (2006). Genital tract infection in asymptomatic

- infertile men and its effect on semen quality. *Iran J Public Health* 35(3):81-84
- Gonzales GF, Munoz G, Sanchez R, Henkel R, Gallegos-Avila G, Diaz-Gutierrez O, Vigil P, Vasquez F, Kortebani G, Mazzolli A et al. (2004). Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male fertility. *Andrologia* 36; 1-23.
- González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. (2012). Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *Int J Mol Sci* 13; 14026-14052.
- Grabe M, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, Wullt B, Cek M, Naber KG, Pickard RS, Tenke P, Wagenlehner F. Guidelines on urological infections. European Association of Urology Guidelines, 2012 edition. European Association of Urology, Arnhem, The Netherlands, pp 1–110.
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185-9.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. (2005). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 20; 226–230.
- Grupo de Trabajo VPH 2007 de la Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones. Virus del papiloma humano. Situación actual, vacunas y perspectivas de su utilización. Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2007.
- Guía Técnica del Proceso de Reproducción Humana Asistida del Servicio Gallego de Salud (SERGAS). Consellería de Sanidad. Xunta de Galicia. Julio de 2011.
- Guidance on Chlamydia control in Europe. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015.
- Günyeli I, Abike F, Dündar I, Aslan C, Tapısız OL, Temizkan O, Payaslı A, Erdemoğlu E. (2011). Chlamydia, Mycoplasma and

Ureaplasma infections in infertile couples and effects of these infections on fertility. *Arch Gynecol Obstet* 283:379-85.

## H

- Haahr T, Jensen JS, Thomsen L, Duus L, Rygaard K, Humaidan P. (2016). Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients. *Hum Reprod* Apr;31(4):795-803.
- Haidl, G. (1990). Macrophages in semen are indicative of chronic epididymal infection. *Arch Androl* 25; 5-11.
- Hannachi H, Elloumi H, Hamdoun M, Kacem K, Zhioua A, Bahri O. (2018). Bacteriospermia: Effects on semen parameters. *Gynecol Obstet Fertil Senol Jun*;46(6):518-523.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
- Henkel R, Schill WB. (1998). Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia* 30; 91-97.
- Henkel R, Ludwig M, Schuppe HC, Diemer T, Schill WB, Weidner W. (2006). Chronic pelvic pain syndrome/chronic prostatitis affect the acrosome reaction in human spermatozoa. *World J Urol* 24; 39-44.
- Henneberg AA, Patton WC, Jacobson JD, Chan PJ. (2006). Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet* 23: 255-9.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* 10:413-417.
- Hill AC, Tucker MJ, Whittingham DG, Craft I. (1987). Mycoplasmas and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 47:652-5.
- Hochreiter WW, Duncan JL, Schaeffer AJ. (2000). Evaluation of the bacterial flora of the prostate using a 16S rRNA gene based polymerase chain reaction. *J Urol* 163; 127-130.
- Horner PJ. European Branch of the International Union against Sexually Transmitted Infection and the European Office of the

- World Health Organization. European guideline for the management of epididymo-orchitis and syndromic management of acute scrotal swelling (2001). *Int J STD AIDS* 12; 88-93.
- Horner PJ, Blee K, Falk L, van der Meijden W, Moi H. (2016). 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS* Oct;27(11):928-37.
- Horner P, Blee K, O'Mahoney C, Muir P, Evans C et al.(2016) On behalf of the clinical effectiveness group of the British Association for Sexual Health and HIV. 2015 UK national Guideline on the management of non-gonococcal urethritis. *Int J STD & AIDS* 27: 85-96.
- Horner P, Donders G, Cusini M, Gomberg M, Jensen JS, Unemo M. (2018). Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? - a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *J Eur Acad Dermatol Venereol* Nov;32(11):1845-1851.
- Hosseinzadeh S1, Eley A, Pacey AA. (2004). Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection. *J Androl* Jan-Feb;25(1):104-9.
- Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, Abdo Z, Forney LJ, Xu C. (2013). Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril* Nov;100(5):1261-9.
- Huang C, Long X, Jing S, Fan L, Xu K, Wang S, Zhu W. (2016). *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections and semen quality in 19,098 infertile men in China. *World J Urol* Jul;34(7):1039-44.

## I

- Imirzalioglu C, Hain T, Chakraborty T, Domann E. (2008). Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections. *Andrologia* 40; 66-71.
- Imudia AN, Detti L, Puscheck EE, Yelian FD, Diamond MP. (2008). The prevalence of *ureaplasma urealyticum*, *mycoplasma hominis*, *chlamydia trachomatis* and *neisseria gonorrhoeae*

infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet* 25:43-6.

Ine (2018).

<http://www.ine.es/jaxi/Tabla.htm?path=/t20/e245/p08/10/&file=02002.px>. Acceso: 02/08/2018.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21; 33-44.

## J

Jakus S, Neuer A, Dieterle S, Bongiovanni AM, Witkin SS. (2008). Antibody to the Chlamydia trachomatis 60 kDa heat shock protein in follicular fluid and in vitro fertilization outcome. *Am J Reprod Immunol* 59; 85-89.

Jarow JP, Kirkland Jr JA, Assimos DG. (1990). Association of antisperm antibodies with chronic nonbacterial prostatitis. *Urology* 36; 154-156.

Jarvi K, Lacroix J-M, Jain A, Dumitru I, Heritz D, Mittelman MW. (1996). Polymerase chain reaction based detection of bacteria in semen. *Fertil and Steril* 66; 463-467.

Jensen, J.S. (2004). *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J. Eur. Acad Dermatol Venereol* 18:1–11.

Jeyendran RS. Interpretation of semen analysis results. A practical guide, 1<sup>st</sup> ed. 2000. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Joly-Guillou ML, Lasry S. Practical recommendations for the drug treatment of bacterial infections of the male genital tract including urethritis, epididymitis and prostatitis. *Drugs* 1999; 57; 743-750.

JORF n°0211 du 11 septembre 2010 page 16522 texte n° 24. Arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.



Judlin PG, Thiebaugeorges O. (2009). Pelvic inflammatory diseases. *Gynecol Obstet Fertil*. 2009 Feb;37(2):172-82.

## K

Kadish HA, Bolte RG. (1998). A retrospective review of pediatric patients with epididymitis, testicular torsion, and torsion of testicular appendages. *Pediatrics* 102; 73–76.

Kafetzis DA, Skevaki CL, Skouteri V, Gavrili S, Peppas K, Kostalos C, Petrochilou V, Michalas S. (2004). Maternal genital colonization with *Ureaplasma urealyticum* promotes preterm delivery: association of the respiratory colonization of premature infants with chronic lung disease and increased mortality. *Clin Infect Dis* Oct 15;39(8):1113-22.

Kaspersen MD, Larsen PB, Ingerslev HJ, Fedder J, Petersen GB, Bonde J, Höllsberg P. (2011). Identification of multiple HPV types on spermatozoa from human sperm donors. *PLoS One* 6:e8095.

Kasprzykowska U, Sobieszczńska B, Duda-Madej A, Secewicz A, Nowicka J, Gościński G. (2018). A twelve-year retrospective analysis of prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* in the province of Lower Silesia in Poland. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* Jan;220:44-49.

Kanakas N, Mantzavinos T, Boufidou F, Koumentakou I, Creatsas G. (1999). *Ureaplasma urealyticum* in semen: is there any effect on in vitro fertilization outcome? *Fertil Steril* 71:523–7.

Karlstrom PO, Hjelm E, Lundkvist O. (1991). Comparison of the ability of two sperm preparation techniques to remove microbes. *Hum Reprod* 6; 386-389.

Kasper, DL y col., 2005. *Harrison's principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York: McGraw-Hill Companies.

Kastrop PMM, de Graaf-Miltenberg LAM, Gutknecht DR, Weima SM. (2007). Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Hum Reprod* 22(8): 2243-2248.

- Kaur S, Prabha V, Sarwal A. (2010). Receptor mediated agglutination of humanspermatozoa by spermagglutinating factor isolated from *Staphylococcus aureus*. *J Urol* 184; 2586–2590.
- Kaver I, Matzkin H, Braf ZF. (1990). Epididymoorchitis: a retrospective study of 121 patients. *J Fam Pract* 30; 548–552.
- Kean , B.H. and Day,E. (1954). *Trichomonas vaginalis* Infection. An Evaluation of Three Diagnostic Techniques with Data on Incidence. *Am. J. Obst. And Gynec.*, 68. 1510-1518.
- Keck C, Gerber-Schäfer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. (1998). Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 4; 891-903.
- Khosropour CM, Manhart LE, Gillespie CW, Lowens MS, Golden MR, Jensen NL, Kenny GE, Totten PA. (2015). Efficacy of standard therapies against *Ureaplasma* species and persistence among men with non-gonococcal urethritis enrolled in a randomised controlled trial. *Sex Transm Infect* Aug;91(5):308-13.
- Kim FY, Goldstein M. (1999). Antibacterial skin preparation decreases the incidence of false-positive semen culture results. *J Urol* Mar;161(3):819-21.
- Kim SJ, Paik DJ, Lee JS, Lee HS, Seo JT, Jeong MS, Lee JH, Park DW, Han S, Lee YK, Lee KH, Lee IH, So KA, Kim SA, Kim J, Kim TJ. (2017). Effects of infections with five sexually transmitted pathogens on sperm quality. *Clin Exp Reprod Med* Dec;44(4):207-213.
- Knox CL, Cave DG, Farrell DJ, Eastment HT, Timms P. (1997). The role of *Ureaplasma urealyticum* in adverse pregnancy outcome. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 37:45–51.
- Knox CL, Allan JA, Allan JM, Edirisinghe WR, Stenzel D, Lawrence FA, et al. (2003). *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. *Fertil Steril* 80; 921-929.
- Krausse R, Schubert S. (2010). In-Vitro activities of tetracyclines, macrolides, fluoroquinolone and clindamycin against

- Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp isolated in Germany over 20 years. *Clin Microbiol Infect* Nov;16(11):1649-55.
- Krieger JN, Berger RE, Ross SO, Rothman I, Muller CH. (1996). Seminal fluid findings in men with nonbacterial prostatitis and prostatodynia. *J Androl* 17; 310-318.
- Krieger JN, Nyberg L Jr, Nickel JC. (1999). NIH consensus definition and classification of prostatitis. *JAMA* 282; 236–237.
- Krieger JN, Ross SO, Deutsch L, Riley DE. (2002). The NIH Consensus concept of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome compared with traditional concepts of nonbacterial prostatitis and prostatodynia. *Curr Urol Rep* 3; 301-306.
- Krieger JN, Lee SW, Jeon J, Cheah PY, Liong ML, Riley DE. (2008). Epidemiology of prostatitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Feb;31 Suppl 1:S85-90.
- Krissi H, Orvieto R, Ashkenazi J, Gilboa Y, Shalev J, Moscovitch I, Bar-Hava I. (2004). Effect of contaminated preprocessed semen on fertilization rate and embryo quality in assisted reproductive techniques. *Gynecol Endocrinol* 18; 63-67.
- Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. (2018). Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2018 Aug;110(3):327-336.
- Kundsinn RB, Leviton A, Allred EN, Poulin SA. (1996). *Ureaplasma urealyticum* infection of the placenta in pregnancies that ended prematurely. *Obstet Gynecol* 87:122–7. 2.
- Kupferberg, AB, Johnson G., Sprince H.. (1948). Nutritional Requirements of *trichomonas vaginalis*. *Proc. Soc. Exper. Biol.. Med.* 67: 304-308.
- Kuzan FB, Hillier SL, Zarutskie PW. (1987). Comparison of three wash techniques for the removal of microorganisms from semen. *Obstet Gynecol* 70; 836-839.

## L

- Lai YM, Yang FP, Pao CC. (1996). Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil Steril* May;65(5):1026-30.
- Laprise C, Trottier H, Monnier P, Coutlée F, Mayrand MH. (2014). Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 29: 640-51.
- La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, D'Agata R, Calogero AE. (2011). Male accessory gland infection and sperm parameters. *Int J Androl* 34; 330-347.
- Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15; 1717-1722.
- Lee MY, Kim MH, Lee WI, Kang SY, Jeon YL (2016). Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Pregnant Women. *Yonsei Med J* 57: 1271-1275.
- Lefever S, Hellemans J, Pattyn F, Przybylski DR, Taylor C, Geurts R, Untergasser A, Vandesompele J; RDML consortium (2009). RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* Apr;37(7):2065-9. Disponible en: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/gkp056>
- Leib Z, Bartoov B, Eltes F, Servadio C. (1994). Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: an enigma or reality? *Fertil Steril* 61; 1109-1116.
- Lemkecher T, Dartigues S, Vaysse J, Kulski O, Barraud-Lange V, Gattegno L, et al. (2005). Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses. *Gynecol Obstet Fertil* 33; 2-10.
- Lenzi A, Mirone V, Gentile V, Bartoletti R, Ficarra V, Foresta C, Mariani L, Mazzoli S, Parisi SG, Perino A, Picardo M & Zotti CM. (2013) Rome Consensus Conference – statement; human papilloma virus diseases in males. *BMC Public Health* 13, 117.

- Ley 3/2001, de 28 de mayo, reguladora del consentimiento informado y de la historia clínica de los pacientes.
- Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.
- Ley 3/2005, de 7 de marzo, de modificación de la Ley 3/2001, de 28 de mayo, reguladora del consentimiento informado y de la historia clínica de los pacientes.
- Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.
- Li L, Zhang Y, Li SW. (2016). Outcomes of intracytoplasmic sperm injection in men with oligoasthenospermia and bacteriospermia. ASRM abstracts, October 18, p-334.
- Liu L, Cao G, Zhao Z, Zhao F, Huang Y. (2014). High bacterial loads of Ureaplasma may be associated with non-specific cervicitis. Scand J Infect Dis Sep;46(9):637-41.
- Longo, MC, Berninger, MS and Hartley, JL. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 93:125-128.
- López-Corbeto E, González V, Bascunyana E, Humet V, Casabona J; Grupo de estudio CT/NG-ASSIR y CT/NG-Prisiones. (2016). [Trends and determinants factors of Chlamydia trachomatis genital infection in young people under 25 years. Catalonia 2007-2014]. Enferm Infecc Microbiol Clin Oct;34(8):499-504.
- Ludwig G and Haselberger J. (1977). [Epididymitis and fertility. Treatment results in acute unspecific epididymitis]. Fortsch Med 95; 397-399.
- Ludwig M, Vidal A, Diemer T, Pabst W, Failing K, Weidner W. (2002). Seminal secretory capacity of the male accessory sex glands in chronic pelvic pain syndrome (CPPS)/chronic prostatitis with special focus on the new prostatitis classification. Eur Urol 42; 24-28.

- Ludwig M, Vidal A, Diemer T, Pabst W, Failing K, Weidner W. (2003). Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome): seminal markers of inflammation. *World J Urol* 21; 82-85.
- Luttmer R, Dijkstra MG, Snijders PJ, Hompes PG, Pronk DT, Hubeek I, Berkhof J, Heideman DA, Meijer CJ. (2016). Presence of human papillomavirus in semen in relation to semen quality. *Hum Reprod* Feb;31(2):280-6.

## M

- MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria. vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Macpherson I. (1966). Mycoplasmas in Tissue Culture. *Journal of Cell Science* 1: 145-168.
- Magri V, Perletti G. (2008). Re: How does the pre-massage and post-massage 2-glass test compare to the meares-stamey 4-glass test in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome? J. C. Nickel, D. Shoskes, Y. Wang, R. B. Alexander, J. E. Fowler, jr., S. Zeitlin, M. P. O'Leary, M. A. Pontari, A. J. Schaeffer, J. R. Landis, L. Nyberg, j. W. Kusek and K. J. Propert *J Urol* 2006; 176: 119-124. *J Urol* 180; 1571-1572.
- Mahony, JB, Coombes, BK, and Chernesky, MA. (2003). Chlamydia and Chlamydophila. In: *Manual of Clinical Microbiology*, (P.R. Murray, ed.) 8th ed., ASM Press, Washington, D.C., 991-1004.
- Mangot-Bertrand J, Fenollar F, Bretelle F, Gamerre M, Raoult D, Courbiere B. Molecular diagnosis of bacterial vaginosis: impact on IVF outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:535–541.
- Marconi M, Pilatz A, Wagenlehner F, Diemer T, Weidner W. (2009). Impact of infection on the secretory capacity of the male accessory glands. *Int Braz J Urol* 35; 299-308; discussion 308-9.
- Marovt M, Keše D, Kotar T, Kmet N, Miljković J, Šoba B, Matičič M. (2015). *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* detected with the same frequency among women with and

- without symptoms of urogenital tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Jun;34(6):1237-45.
- Martínez MA. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual (ITS). Parte 1. ITS no virales. *Rev Chil Infect* 26:529-39.
- Mata, L.J., C. Carrillo, and E. Villatoro. (1969). Fecal microflora in healthy persons in a preindustrial region. *Appl Microbiol* 17:596-602.
- Mateos Lindemann ML, Pérez-Castro S, Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. 57. Mateos Lindemann ML (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.
- Mayo DM, Barrios E, Ruiz R, Cedillo L, Rivera JA. (2009). Aislamiento de mollicutes en faringe y tracto urogenital. *Enf Inf Microbiol* 29:6-10.
- McNeeley SG Jr. (1992). Pelvic inflammatory disease. *Curr Opin Obstet Gynecol* Oct;4(5):682-6.
- Meares EM, Stamey TA. (1968). Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Invest Urol* 5; 492-518.
- Medvedev BI, Zaïnetdinova LF, Teplova SN. (2008). Microflora of reproductive system in women with tubal-peritoneal sterility. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* May-Jun;(3):58-62.
- Mehta RH, Sridhar H, Vijay Kumar BR, Anand Kumar TC. (2002). High incidence of oligozoospermia and teratozoospermia in human semen infected with the aerobic bacterium *Streptococcus faecalis*. *Reprod Biomed Online* 5; 17-21.
- Meinhardt A, Hedger MP. (2011). Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol* 335; 60-68.



- Menkveld R. (2010). Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian Journal of Andrology* 12: 47–58.
- Mensa J, Gatell JM, JE García (2017) Guía de terapéutica antimicrobiana. Ed Antares. Barcelona, Spain.
- Michael W. Pfaff, Ales Tichopad, Christian Prgomet and Tanja P. Neuvians. (2005). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations *Biotechnology Letters* 26:509-515.
- Miller WC, Ford CA, Morris M, Handcock MS, Schmitz JL, Hobbs MM, Cohen MS, Harris KM, Udry JR. (2004). Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *JAMA* 291:2229-36.
- Mobley DF. (1975). Semen culture in the diagnosis of bacterial prostatitis. *J Urol* 114; 83-85.
- Monem MO, Saad AS, Saher A. Eissa and El-DougDoug KA. (2013). Potency of bacteriospermia and Sperm Quality in Leukocytospermic infertile males. *Life Science Journal*;10(3):1413-19.
- Monga M, Roberts JA. (1994). Spermagglutination by bacteria: receptor-specific interactions. *J Androl* 15; 151-156.
- Montagut JM, Lepretre S, Degoy J, Rousseau M. (1991). Ureaplasma in semen and IVF. *Hum Reprod* May;6(5):727-9.
- Moore DE, Ashley RL, Zarutskie PW, Coombs RW, Soules MR, Corey L. (1989). Transmission of genital herpes by donor insemination. *JAMA* 1989; 261: 3441-3.
- Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, Collodel G. (2009). The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet* 26; 47-56.
- Mortimer, D. (2000). Sperm preparation methods. *J. Androl.*, 21: 357-366.



- Mostafa RM, Nasrallah YS, Hassan MM, Farrag AF, Majzoub A, Agarwal A. (2018). The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia* Apr;50 (3): e12910.
- Motrich RD, Maccioni M, Ponce AA, Gatti GA, Oberti JP, Rivero VE. (2006). Pathogenic consequences in semen quality of an autoimmune response against the prostate gland: from animal models to human disease. *J Immunol* 177; 957-967.
- Muller CH, Berger RE, Mohr LE, Krieger JN. (2001). Comparison of microscopic methods for detecting inflammation in expressed prostatic secretions. *J Urol* 166; 2518-2524.
- Muñoz N, F.X. Bosch, S. de Sanjosé, R. Herrero, X. Castellsagué, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, and Chris J.L.M. Meijer, for the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. (2003). "Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer" *N Engl J Med* 348(6):518-527.
- Murtha AP, Edwards JM. (2014). The role of Mycoplasma and Ureaplasma in adverse pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol Clin North Am* Dec;41(4):615-27.

## N

- Naber, KG y Weidner, W. Prostatitis, Epididymitis and Orchitis. En: Armstrong, D. and Cohen, J., Eds., *Infectious Diseases*. Londres: Mosby, Hartcourt Publishers, Ltd, 1999, págs. 1-58.
- Naessens A, Foulon W, Debrucker P, Devroey P, Lauwers S. (1986). Recovery of microorganisms in semen and relationship to semen evaluation. *Fertil Steril* 45:101-5.
- Naumenko V, Tyulenev Y, Kurilo L, Shileiko L, Sorokina T, Evdokimov V, Yakovleva V, Kovalyk V, Malolina E, Kulibin A, Gomberg M, Kushch A. (2014). Detection and quantification of human herpes viruses types 4-6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases. *Andrology* Sep;2(5):687-94.

- Navarro Espigares JL, Martínez Navarro L, Castilla Alcalá JA, Hernández Torres E. (2006). Coste de las técnicas de reproducción asistida en un hospital público. *Gac Sanit* 20(5):382-91.
- Neofytou E, Sourvinos G, Asmarianaki M, Spandidos DA, Makrigiannakis A. (2009). Prevalence of human herpes virus types 1-7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. *Fertil Steril Jun*;91(6):2487-94.
- Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E. (2000). Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Hum Reprod* 15; 662-666.
- Nickel JC, Olson ME, Costerton JW. (1991). Rat model of experimental bacterial prostatitis. *Infection* 19; S126-S130.
- Nickel JC. (1997). The pre and post massage test (PPMT): a simple screen for prostatitis. *Tech Urol* 1997; 3; 38-43.
- Nickel JC. (2003). Clinical evaluation of the patient presenting with prostatitis. *Eur Urol Suppl* 2; 11-14.
- Nickel JC, Shoskes D, Wang Y, Alexander RB, Fowler JE Jr, Zeitlin S, O'Leary MP, Pontari MA, Schaeffer AJ, Landis JR et al. (2006). How does the pre-massage and post-massage 2-glass test compare to the Meares-Stamey 4-glass test in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome? *J Urol* 176; 119-124.
- Nickel JC. (2011). Prostatitis. *Can Urol Assoc J* 5; 306-315.
- Nickel JC. (2012). Lower urinary tract symptoms associated with prostatitis. *Can Urol Assoc J* 6; S133-135
- Nieschlag E, Behre H. *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. 1997. Springer, Berlin, Germany.
- Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, Verheijen RH, Meijer CJ. (2001). Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 358(9295):1782-1783.

- Nogales MC, Castro C, Ramírez M, Pueyo I, Pérez L, Jarana R, Martín E. (2007). Diagnóstico de la infección por *Chlamydia trachomatis* en un centro de diagnóstico y prevención de infecciones de transmisión sexual: evaluación de los exudados cervicales, uretrales y rectales mediante la técnica de PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25: 11-15
- Núñez JT. (1999). *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en diferentes patologías ginecológicas. *Invest Clin* 40:9-24.
- Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer MA. (1998). *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13; 2756-2761.
- Núñez R, Cortés S, Gago M, Pueyo A, Peramo B, Caballero C. (2007). Microbiological analysis of semen cultures in men undergoing evaluation for infertility. *Rev Int Androl* 5; 206-211.

## O

- Ochsendorf FR. (2008). Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* Apr; 40(2):72-5.
- Odendaal HJ, Schoeman J. (2006). The association between *Chlamydia trachomatis* genital infection and spontaneous preterm labour. *S Afr J Obstet Gynaecol* 12(3):146-149.
- Ohri M, Prabha V. (2005). Isolation of a sperm-agglutinating factor from *Staphylococcus aureus* isolated from a woman with unexplained infertility. *Fertil Steril* 84; 1539-1541.
- Olomu IN, Hecht JL, Onderdonk AO, Allred EN, Leviton A. (2009). Extremely Low Gestational Age Newborn Study Investigators. Perinatal correlates of *Ureaplasma urealyticum* in placenta parenchyma of singleton pregnancies that end before 28 weeks of gestation. *Pediatrics* May;123(5):1329-36.
- Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandeput H, Gielen J, Pollet H, Maes M, et al. (1997). Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod* 12; 987-993.

- Orden B, Martínez R. (2000). ¿Existen las infecciones urinarias por *Streptococcus pyogenes*?. *Enferm Infecc Microbiol Clin Nov*;18(9):486-7.
- Orden SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano.
- Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización.

## P

- Pacey AA, Eley A. (2004). Chlamydia trachomatis and male fertility. *Human Fertility* 7; 271-276.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. (2000). Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology* 55; 881-885.
- Pelzer ES, Allan JA, Waterhouse MA, Ross T, Beagley KW, Knox CL. (2013). Microorganisms within human follicular fluid: effects on IVF. *PLoS One* 8(3):e59062.
- Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. (2008). Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 140; 3-11.
- Pergialiotis V, Karampetsou N, Perrea DN, Konstantopoulos P, Daskalakis G. (2018). The Impact of Bacteriospermia on Semen Parameters: A Meta-Analysis. *J Family Reprod Health Jun*;12(2):73-83.
- Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, Ruvolo G, Fiorentino FP, Alimondi P, Cefalù E, Ammatuna P. (2011). Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril* 95: 1845-8.

- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. (2002). Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.* 30: e36.
- Pignanelli S, Pulcrano G, Schiavone P, Lula VD, Catania MR (2015) In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hominis* genital isolates. *Indian J Dermatol Venerol Leprol* 81:286-288.
- Pónyai K, Ostorházi E, Farkas B, Párducz L, Marschalkó M, Kárpáti S, Rozgonyi F. (2013). Incidence and antibiotic susceptibility of genital mycoplasmas in sexually active individuals in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32: 1423-1426.
- Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. (2000). Association of ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol* 163: 1775 -1778.
- Power, D.A. (ed.), and P.J. McCuen. 1988. Manual of BBL products and laboratory procedures, 6th ed. Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD.
- Prabath K Abeyesundara, DMAB Dissanayake, Prasantha S Wijesinghe, RRDP Perera, and AAN Nishad. (2013). Efficacy of two sperm preparation techniques in reducing non-specific bacterial species from human semen. *J Hum Reprod Sci* Apr-Jun; 6(2): 152–157.
- Prabha V, Gupta T, Kaur S, Kaur N, Kala S, Singh A. (2009). Isolation of a spermatozoa immobilization factor from *Staphylococcus aureus* filtrates. *Can J Microbiol* 55; 874–878.
- Prabha V, Sandhu R, Kaur S, Kaur K, Sarwal A, Mavuduru RS, Singh SK. (2010). Mechanism of sperm immobilization by *Escherichia coli*. *Adv Urol* 2010; 1-6.
- Practice Bulletin No. 168 Summary: Cervical Cancer Screening and Prevention. *Obstet Gynecol.* 2016 Oct;128(4):923-5.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Guidelines for reducing the risk of viral transmission during fertility treatment. *Fertil Steril* 2008; 90: S156-62.

Protocolo asistencial uretritis/cercicitis aprobado por la Comisión de Infección Hospitalaria, Profilaxis y Política Antibiótica del Hospital Universitario Son Dureta. [Internet]. Palma de Mallorca: 10/10/2010. [consultado el 13/02/2019]. Disponible en:

<http://www.elcomprimido.com/FARHSD/ComisionInfeccionesHUSD/Documentos/Guias%20de%20tratamiento/infeccion%20genitourinaria/Uretritis%20y%20cervicitis%202010.pdf>  
Consultado: 13/02/2019.

Punab M, Lõivukene K, Kermes K, Mändar R. (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia* 35; 271-278.

Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. (1993). Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl* 16; 1-13.

Purvis K and Christiansen E. (1995). The impact of infection in sperm quality. *J Br Fertil Soc* 1; 31-41.

## Q

Qian L, Bian GR, Li HB, Zhou Y, Dong SD, Wang WJ, Song J. (2016). Effects of Ureaplasma urealyticum Infection on Sperm Quality and Concentrations of Nitric Oxide and Cytokine in the Semen of Infertile Males. *Am J Reprod Immunol Jun*;75(6):605-8.

## R

Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.

Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

- Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM (2014). Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infect Dis* Mar 28;14: 171-177.
- Registro Nacional de Actividad 2015-Registro SEF. [https://www.registrosef.com/public/docs/sef2015\\_IAFIVm.pdf](https://www.registrosef.com/public/docs/sef2015_IAFIVm.pdf).
- Reichart M, Kahane I, Bartoov B. (2000). In vivo and in vitro impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted *Ureaplasma urealyticum* infection. *Biol Reprod* 63; 1041-1048.
- Reischelderfer, C., and J.I. Mangels. 1994. Culture media for anaerobes, p. 231-238. In H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol.1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Riedel HH, Langenbucher H, Mettler L. (1986). Significance of sperm bacteriology for the in vitro fertilization of human and mouse oocytes. *J Reprod Med* 31:605-8.
- Rodríguez-Domínguez M, Sanbonmatsub S, Salinas J, Alonso R, Gutiérrez J, Galán JC. (2014). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32:380-5.
- Rodríguez R, Hernández R, Torres A, Prieto P, Alberto J. Infección genital y esterilidad. (2001). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 19, Issue 6, 261-266.
- Rose BI, Scott B. (1994). Sperm motility, morphology, hyperactivation, and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasmas. *Fertil Steril* 61:341-8.
- Rosemond A, Lanotte P, Watt S, Sauget AS, Guerif F, Royère D, et al. (2006). Systematic screening tests for *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in urogenital specimens of infertile couples. *Pathol Biol (Paris)* 54:125-9.
- Rours, G.I., Smith-Norowitz, T.A., Ditkowsky, J., Hammerschlag, M.R., Verkooyen, R.P., de Groot, R., Verbrugh, H.A. & Postma, M. (2016). Cost-effectiveness analysis of *Chlamydia*



- trachomatis screening in Dutch pregnant women, *Pathogens and Global Health*, Oct - Dec, 110:7-8, 292-302.
- Rowley J, Toskin I, Ndowa F. (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. Switzerland: World Health Organization.
- Rutala WA, Weber DJ, HICPAC. (2008). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2008.
- Rowe P, Comhaire F, Hargreave TB & Mellows HJ. (1993) (eds) World Health Organization Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge University Press, Cambridge.
- Male accessory gland infection and sperm parameters (PDF Download Available). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/51241443\\_Male\\_accessory\\_gland\\_infection\\_and\\_sperm\\_parameters](https://www.researchgate.net/publication/51241443_Male_accessory_gland_infection_and_sperm_parameters) [accessed Mar 25 2018].

## S

- Sabouraud, R. (1892). Contribution a l'etude de la trichophytie humaine. Etude clinique, microscopique et bacteriologique sur la pluralité des trichophytons de l'homme. *Ann Dermatol Syphil* 3: 1061-1087.
- Salah RM, Allam AM, Magdy AM, Mohamed AS. Bacterial vaginosis and infertility: cause or association? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 167:59-63.
- Sánchez V, Torres AE, Villalba JD. (2009). Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* mediante PCR en pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional. *Ginecol Obstet Mex* 77:13-8.
- Sanocka D, Fraczek M, Jedrzejczak P, et al. (2004). Male genital tract infection: An influence of leukocytes and bacteria on semen. *J Reprod Immunol* 62;111-124.



- Schaedler, R.W., R. Dubos, and R. Costello. (1965). The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J Exp Med* 122:59-66.
- Schaeffer AJ, Anderson RU, Krieger JN. The assessment and management of male pelvic pain syndrome including prostatitis. In: McConnel J, Abrams P, Denis L, Khoury S, Roehrsom C, editors. Male lower urinary tract dysfunction. Evaluation and management. 6th International Consultation in Prostate Cancer and Prostate Diseases. 2006. Health Publications, Paris, France, pp. 343-385.
- Schiefer HG. Mikrobiologische Untersuchungen. In: Krause W and Rothauge CF (eds.). *Andrologie*. 1991. Enke, Stuttgart, Germany, pp 66-71.
- Schiefer HG, Jantos C, Weidner W. (1994). Urethroadnexitis des Mannes und akutes Urethrasyndrom der Frau. *Urologe A* 33; 188-195.
- Schiefer HG. (1998). Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for aetiologic classification. *Andrologia* 30; 7-13.
- Schillaci R, Capra G, Bellavia C, Ruvolo G, Scazzone C, Venezia R, Perino A. (2013). Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril* 100: 1236-40.
- Schlegel PN, Chang TS, Marshall FF. (1991). Antibiotics: potential hazards to male fertility. *Fertil Steril* 55; 235-242.
- Schneider H, Ludwig M, Hossain HM, Diemer T, Weidner W. (2003). The 2001 Giessen Cohort Study on patients with prostatitis syndrome - an evaluation of inflammatory status and search for microorganisms 10 years after a first analysis. *Andrologia* 35; 258-62.
- Schneider H, Brähler E, Ludwig M, Hochreiter W, Collins MF, Eremenco S, Weidner W. (2004). Two-year experience with the German-translated version of the NIH-CPSI in patients with CP/CPPS. *Urology* 63; 1027-30.

- Schneider SC, Tinguely R, Droz S, Hilty M, Dona V, Bodmer T, Endimiani A. (2015). Antibiotic susceptibility and sequence type distribution of *Ureaplasma* species isolated from genital samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 6026-6031.
- Seifoleslami M, Safari A, Khayyat Khameneie M. (2015). Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in High Vaginal Swab Samples of Infertile Females. *Iran Red Crescent Med J* Dec 26;17(12):e16823.
- Sellami H, Znazen A, Sellami A, Mnif H, Louati N, Ben Zarrouk S, Keskes L, Rebai T, Gdoura R, Hammami A. (2014). Molecular detection of *Chlamydia trachomatis* and other sexually transmitted bacteria in semen of male partners of infertile couples in Tunisia: the effect on semen parameters and spermatozoa apoptosis markers. *PLoS One* Jul 14;9(7):e98903.
- SEMFyC. Como actuar ante el consumo de alcohol:guia de referencia para profesionales de atencion primaria.Grupo de Educación Sanitaria y Promoción de la salud del PAPPS. SemFYC, Barcelona: 2005.
- De Seta F, Banco R, Turrisi A, Airoud M, De Leo R, Stabile G, Ceccarello M, Restaino S, De Santo D. (2012). Pelvic inflammatory disease (PID) from *Chlamydia trachomatis* versus PID from *Neisseria gonorrhea*: from clinical suspicion to therapy. *G Ital Dermatol Venereol* Oct;147(5):423-30.
- Shalhoub D, Abdel-Latif A, Fredericks CM, Mathur S, Rust PF. (1986). Physiological integrity of human sperm in the presence of *Ureaplasma urealyticum*. *Arch Androl* 16:75–80.
- Shalika S, Dugan K, Smith RD, Padilla SL. (1996). The effect of positive semen bacterial and *Ureaplasma* cultures on in-vitro fertilization success. *Hum Reprod* 11:2789–92.
- Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. (2016). Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization laboratory methods for the examination of human semen. *Eur Urol* Oct;70(4):635-645.

- Shimada Y, Ito S, Mizutani K, Sugawara T, Seike K, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Yasuda M, Deguchi T. (2014). Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. *Int J STD AIDS* Mar;25(4):294-8.
- Shivaji S. (1984). Antimicrobial activity of semen. *Trends Biochem Sci* 9; 104-107.
- Skerk V, Schönwald S, Krhen I, Rusinovic M, Strapac Z, Vukovic J. (2001). Azithromycin and doxycycline in the treatment of female patients with acute urethral syndrome caused by *Ureaplasma urealyticum*: significance of duration of clinical symptoms. *Drugs Exp Clin Res* 27:135-139.
- Sirota I, Zarek SM, Segars JH. (2014). Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med* Jan;32(1):35-42.
- Smith PF. (1960). Amino acid metabolism of PPLO. *Ann N Y Acad Sci* Jan 15;79:543-50.
- Sobouti B, Fallah S, Mobayen M, Noorbakhsh S, Ghavami Y. (2014). Colonization of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women and their transmission to offspring. *Iran J Microbiol* Aug;6(4):219-24.
- Soper DE. (1994). Pelvic inflammatory disease. *Infect Dis Clin North Am* Dec;8(4):821-40.
- Soper D. (2004). Trichomoniasis: under control or undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol* 190; 281-290.
- Spandorfer SD, Bongiovanni AM, Fasioulotis S, Rosenwaks Z, Ledger WJ, Witkin SS. (2006). Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertil Steril* 86: 765-7.
- Sun LS, Gastaldi C, Peterson EM, de la Maza LM, Stone SC. (1987). Comparison of techniques for the selection of bacteria-free sperm preparations. *Fertil Steril* 48; 659-663.
- Sung TJ, Xiao L, Duffy L, Waites KB, Chesko KL, Viscardi RM. (2011). Frequency of *ureaplasma* serovars in respiratory

- secretions of preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Infect Dis J* May;30(5):379-83.
- Sutton, D.A. 2003. Specimen Collection, transport, and processing: mycology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. (2003). *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Hum Reprod* 18; 2103-2109.
- Sweeney EL, Dando SJ, Kallapur SG, Knox CL. (2016a). The Human *Ureaplasma* Species as Causative Agents of Chorioamnionitis. *Clin Microbiol Rev* Dec 14;30(1):349-379. Print 2017 Jan.
- Sweeney EL, Kallapur SG, Meawad S, Gisslen T, Stephenson SA, Jobe AH, Knox CL. (2017). *Ureaplasma* Species Multiple Banded Antigen (MBA) Variation Is Associated with the Severity of Inflammation In vivo and In vitro in Human Placentae.
- Sweeney EL, Kallapur SG, Gisslen T, Lambers DS, Chougnet CA, Stephenson SA, Jobe AH, Knox CL. (2016b). Placental Infection With *Ureaplasma* species Is Associated With Histologic Chorioamnionitis and Adverse Outcomes in Moderately Preterm and Late-Preterm Infants. *J Infect Dis* Apr 15;213(8):1340-7.
- Swenson CE, Toth A, O'Leary WM. (1979). *Ureaplasma urealyticum* and human infertility: the effect of antibiotic therapy on semen quality. *Fertil Steril* Jun;31(6):660-5.

## T

- Talkington DF, Davis JK, Canupp KC, Garrett BK, Waites KB, Huster GA, et al. (1991). The effects of three serotypes of *Ureaplasma urealyticum* on spermatozoal motility and penetration in vitro. *Fertil Steril* 55: 170–6.
- Taylor-Robinson D, Furr PM. (1998). Update on sexually transmitted mycoplasmas. *Lancet* 351; 12-15.

- Tomar DME, Chamberlin J, Allen L, Olson S, Donlon T, Barton S, Sheehy R, Waggoner D. (1984). Preferential paternal origin of de novo structural chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 36; 115.
- Tournaye H, Verheyen G, Albano C, Camus M, Van Landuyt L, Devroey P, Van Steirteghem A. (2002). Intracytoplasmatic sperm injection versus in vitro fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. *Fertil Steril* 78 (5):1030-37.
- Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14;243-258.
- Trojan TH, Lishnak TS, Heiman D. (2009). Epididymitis and orchitis: an overview. *Am Fam Physician* 79; 583-587.
- Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. (2017). Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol* Jan;216(1):1-9.
- Tucker MJ, Wong CJ, Chan YM, Leong MK, Leung CK. (1990). Post-operative artificial insemination--does it improve GIFT outcome? *Hum Reprod* Feb;5(2):189-92.
- Türk S, Korrovits P, Punab M, Mändar R. (2007). Coryneform bacteria in semen of chronic prostatitis patients. *Int J Androl* 30; 123-128.
- Türk S, Mazzoli S, Stšepetova J, Kuznetsova J, Mändar R. (2014). Coryneform bacteria in human semen: inter-assay variability in species composition detection and biofilm production ability. *Microb Ecol Health Dis* 14; 25.
- Tuttle JP Jr, Holbrook TW, Derrick FC. (1977a). Interference of human spermatozoal motility by trichomonas vaginalis. *J Urol* 118; 1024-1025.
- Tuttle JP Jr, Bannister ER, Derrick FC. (1977b). Interference of human spermatozoal motility and spermatozoal agglutination by *Candida albicans*. *J Urol* 118; 797-799.

## U

Unidad de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2016. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología/Subdirección General de Promoción de la Salud y Vigilancia en Salud Pública - Plan Nacional sobre el Sida; 2018

Upadhyaya M, Hibbard BM, Walker SM. (1984). The effect of *Ureaplasma urealyticum* on semen characteristics. *Fertil Steril* 41:304–8.

Urata K, Narahara H, Tanaka Y, et al. (2001). Effect of endotoxin-induced reactive oxygen species on sperm motility. *Fertil Steril* 76; 163-166.

Urbina MT, Medina R, Muñoz G, Sánchez V, Benjamín I, Lerner J. (2010). Infección por *Chlamydia trachomatis*. *Rev Obstet Ginecol Venez* 70:90-6.

## V

Van Der Pol B. (2013). Cobas(R) 4800: a fully automated system for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 13:131–140.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 3: 1–12.

van Engeland M1, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* Jan 1;31(1):1-9.

van Oostrum N, De Sutter P, Meys J, Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2013 Jul;28(7):1809-15.

Vera, H.D. (1944). Comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. *J Bacteriol* 47:59-65.

- Veznik Z, Pospisil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V. (2004). Chlamydiae in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sperm. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83; 656-660.
- Vicari E, Calogero AE. (2001). Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatitis-epididymitis. *Hum Reprod* 16; 2338-2342.
- Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. (2002). Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 34; 155-161.
- Virecoulon F, Wallet F, Fruchart-Flamenbaum A, Rigot JM, Peers MC, Mitchell V, Courcol RJ. (2005). Bacterial flora of the low male genital tract in patients consulting for infertility. *Andrologia* Oct;37(5):160-5.
- Vouga M, Greub G, Prod'homme G, Durussel C, Roth-Kleiner M, Vasilevsky S, Baud D. (2014). Treatment of genital mycoplasma in colonized pregnant women in late pregnancy is associated with a lower rate of premature labour and neonatal complications. *Clin Microbiol Infect* Oct;20(10):1074-9.

## W

- Wagenlehner FME, Weidner W, Naber KG. (2006). Chlamydia infections in urology. *World J Urol* 24; 4-12.
- Wagenlehner FM, Weidner W, Naber KG. (2007). Therapy for prostatitis, with emphasis on bacterial prostatitis. *Expert Opin Pharmacother* 8; 1667-1674.
- Wagenlehner FM, Naber KG, Bschleipfer T, Brähler E, Weidner W. (2009). Prostatitis and male pelvic pain syndrome: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 106; 175-83.
- Wagenlehner F, Pilatz A, Bschleipfer T, Diemer T, Weidner W. Prostatitis syndrome. In: Hamdy FEI (ed) *The Oxford textbook of urological surgery*. 2013. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Wagenlehner FM, Pilatz A, Bschleipfer T, Diemer T, Linn T, Meinhardt A, Schagdarsurengin U, Dansranjav T, Schuppe

- HC, Weidner W. (2013). Bacterial prostatitis. *World J Urol* 31; 711-716.
- Wan L, Chen L, Huang J, Yang JG, Sun DG, Wang H, Zhou XY, Huang GN, Sheng HQ. (2018). Bacterial culture of donor semen: Analysis of results. *Zhonghua Nan Ke Xue Jun*;24(6):504-508
- Weidner W, Schiefer HG, Garbe C. (1987). Acute nongonococcal epididymitis. Aetiological and therapeutic aspects. *Drugs* 34; 111-117.
- Weidner W, Garbe C, Weissbach L, Harbrecht J, Kleinschmidt K, Schiefer HG, Friedrich HJ. (1990). [Initial therapy of acute unilateral epididymitis using ofloxacin. II. Andrological findings.] *Urologe A* 29; 277-280.
- Weidner W, Schiefer HG, Krauss H, Jantos C, Friedrich HJ, Altmannsberger M. (1991a). Chronic prostatitis: a thorough search for etiologically involved microorganisms in 1,461 patients. *Infection* 19; 119-125.
- Weidner W, Schiefer HG, Brahler E. (1991b). Refractory chronic bacterial prostatitis: a re-evaluation of ciprofloxacin treatment after a median followup of 30 months. *J Urol* 146; 350-352.
- Weidner W, Jantos C, Schiefer HG, Haidl G, Friedrich HJ. (1991c). Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis. *Arch Androl* 26; 173-183.
- Weidner W, Diemer T, Huwe P, Rainer H, Ludwig M. (2002). The role of Chlamydia trachomatis in prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 19;466-470.
- Weidner W, Wagenlehner FME, Diemer T. Chlamydia infections of the male. What is relevant for urologists? *Urologe* 2006; 12; 1504-1508.
- Weidner W, Wagenlehner FM, Marconi M, Pilatz A, Pantke KH, Diemer T. (2008a). Acute bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: andrological implications. *Andrologia* 40; 105-112.



- Weidner W, Anderson RU. (2008b). Evaluation of acute and chronic bacterial prostatitis and diagnostic management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome with special reference to infection/inflammation. *Int J Antimicrob Agents* 31; S91-95.
- Whitlock EP, Vesco KK, Eder M, Lin JS, Senger CA, Burda BU. (2011). Liquid-based cytology and human papillomavirus testing to screen for cervical cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 155:687,697, W214-5. 24
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5<sup>th</sup> edn, 2010. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Wilkins, T.D., S.L. Chalgren, F. Jimenez-Ulate, C.R. Drake, Jr., and J.L. Johnson. (1976). Inhibition of *Bacteroides fragilis* on blood agar plates and reversal of inhibition by added hemin. *J Clin Microbiol* 3:359-363.
- Wittermer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongièrès C, Viville S, Nisand I. (2004). Abnormal bacterial colonisation of the vagina and implantation during assisted reproduction. *Gynecol Obstet Fertil* 32; 135-139.
- Wolff H, Neubert U, Zebhauser M, Bezold G, Korting H, Meurer M. (1991). Chlamydia trachomatis induces an inflammatory response in the male genital tract and is associated with altered semen quality. *Fertil Steril* 55; 1017-1019.
- Wolner-Hanssen P, Mårdh PA. (1984). In vitro tests of the adherence of Chlamydia trachomatis to human spermatozoa. *Fertil Steril* 42; 102-107.
- Workowski KA, Berman SM. (2002). CDC sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Clin Infect Dis* 35; S135-137.
- Workshop Committee of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK). Chronic prostatitis workshop. Bethesda, Maryland, 1995, Dec 7-8.
- World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3rd edn, 1992. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn, 1999. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Wortley PM, Hammett TA, Fleming PL. (1998). Donor insemination and human immunodeficiency virus transmission. *Obstet Gynecol* 91: 515-8.

## X

Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF. (1997). The correlation of *Ureaplasma urealyticum* infection with infertility. *Andrologia* 29:219–26.

## Y

Yang R, Wang Y, Qiao J, Liu P, Geng L, Guo YL. (2013). Does human papillomavirus infection do harm to in-vitro fertilization outcomes and subsequent pregnancy outcomes? *Chin Med J (Engl)* Feb;126(4):683-7.

Yilmaz S, Koyuturk M, Kilic G, Alpak O, Aytoz A. (2005). Effects of leucocytospermia on semen parameters and outcomes of intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 28; 337-342.

Yoon BI, Kim S, Han DS, Ha US, Lee SJ, Kim HW et al. (2012). Acute bacterial prostatitis: how to prevent and manage chronic infection? *J Infect Chemother* 18; 444–450.

Yoshida T1, Deguchi T, Meda S, Kubota Y, Tamaki M, Yokoi S, Yasuda M, Ishiko H. (2007). Quantitative detection of *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in urine specimens from men with and without urethritis by real-time polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis* Jun;34(6):416-9.

## Z

Zacharis K, Messini CI, Anifandis G, Koukoulis G, Satra M, Daponte A. (2018). Human Papilloma Virus (HPV) and Fertilization: A Mini Review. *Medicina (Kaunas)* Jul 27;54(4).

- Zeighami H, Peerayeh SN, Yazdi RS, Sorouri R. (2009). Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in semen of infertile and healthy men. *Int J STD AIDS* Jun;20(6):387-90.
- Zeyad A, Amor H, and Hammadeh ME. (2017). The Impact of Bacterial Infections on Human Spermatozoa. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences* Vol. 5, No. 4, October, 243–252.
- Zhang W, Xiao J, Ma C. (2012). Clearance of high-risk HPV infection in Chinese women with normal cervical cytology. *Int J Gynaecol Obstet* 118: 74–5.
- Zhang Q, Xiao Y, Zhuang W, Cheng B, Zheng L, Cai Y, Zhou H, Wang Q. (2014). Effects of biovar I and biovar II of *ureaplasma urealyticum* on sperm parameters, lipid peroxidation, and deoxyribonucleic acid damage in male infertility. *Urology* Jul;84(1):87-92.
- Zheng J, Yu SY, Jia DS, Yao B, Ge YF, Shang XJ, Huang YF. (2008). *Ureaplasma urealyticum* infection in the genital tract reduces seminal quality in infertile men. *Zhonghua Nan Ke Xue* 14; 507–12.
- Zhou Y, Xu XL, Wang CP, Zhou M, Zeng XH. (2011). Detection and the antibiotic susceptibility analysis of mycoplasma and chlamydia in urogenital tract infections of 327 cases patients with tubal infertility. *Zhonghua Shi Yan HeLin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 25:201-4.
- Zhou YH, Ma HX, Yang Y, Gu WM. (2018). Prevalence and antimicrobial resistance of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* isolated from semen samples of infertile men in Shanghai, China from 2011 to 2016. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Apr;37(4):729-734.
- Zhou Z, Zeng F, Yuan J, Tang J, Colditz GA, Tworoger SS, Trabert B, Su X. (2017). Pelvic inflammatory disease and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control* May;28(5):415-428.

- Zhu GJ, Wei YL, Hu J, Liu Q. (2004). Microorganism contamination in in vitro fertilization-embryo transfer system and their sources. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi Jun*;39(6):382-4.
- Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. (2003). Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 26; 279-285.



## **11 MATERIAL SUPLEMENTARIO**





# Anexo 1. Características de los medios de cultivo utilizados para el estudio de ITREM en las muestras de orina y semen.

De los muchos medios de cultivo diferentes existentes, se resumen en la tabla Anexo 1 las características fundamentales de los medios utilizados en este estudio y que se detallan en particular más abajo.

**Tabla Anexo 1. Características de los medios de cultivo utilizados para el estudio de ITREM en las muestras de orina y semen.**

MEDIO	COMPONENTES PRINCIPALES	CARACTERÍSTICAS	USOS	VISUALIZACIÓN DE LAS COLONIAS
<i>Medios comunes y enriquecidos: sin agentes inhibidores</i>				
<b>MEDIOS SÓLIDOS</b>				
Agar sangre (Columbia)	Peptona, caseína, extracto de levadura y Extracto de carne de vaca, almidón, agar, 5% de sangre de oveja	Diferencial al añadirle sangre, permite ver distintos tipos de hemólisis	Aislamiento de la gran mayoría de microorganismos, incluidos algunos muy exigentes al añadirle sangre. No permite el crecimiento de <i>Neisseria</i> y <i>Haemophilus</i> .	Distingue tres tipos de hemólisis: * $\beta$ -hemólisis o hemólisis total * $\alpha$ -hemólisis o hemólisis parcial * $\gamma$ -hemólisis o no hemólisis
Agar Chocolate	Agar sangre, con la sangre lisada (por calentamiento a 80°C). Los eritrocitos lisados liberan la hemoglobina y otros nutrientes como factor X (hemina) y factor V (NAD)	Ya no es diferencial	Medio rico que permite el crecimiento de una gran mayoría de los microorganismos, incluidos los muy exigentes como <i>Neisseria</i> y <i>Haemophilus</i>	-----

MEDIO	COMPONENTES PRINCIPALES	CARACTERÍSTICAS	USOS	VISUALIZACIÓN DE LAS COLONIAS
Medio Schaedler	Peptona triptícase, extracto de levadura reducido, dextrosa reducida, aumento del contenido de cloruro de sodio, Vitamina K1 y 5% de sangre de oveja	Selectivo	Aislamiento no selectivo de anaerobios y para el aislamiento selectivo de bacilos anaerobios gram negativos, en especial las especies Bacteroides y Prevotella y otros anaerobios gram negativos diversos	-----
<b>MEDIO LÍQUIDO (CALDO)</b>				
Medio Tioglicolato	Caldo suplementado con caseína, extracto de levadura y de carne y tioglicolato. Para anaerobios, se añade hemina y vitamina K.	Caldo más utilizado en microbiología clínica. Bajo potencial redox.	Favorece el crecimiento de aerobios, microaerófilos, y anaerobios, incluso microorganismos exigentes. Bajo potencial redox, favorece la recuperación de anaerobios.	-----



MEDIO	COMPONENTES PRINCIPALES	CARACTERÍSTICAS	USOS	VISUALIZACIÓN DE LAS COLONIAS
<b>Medios selectivos</b>				
Agar Sabouraud con cloranfenicol	Peptonas, Glucosa, agente inhibidores de bacterias (antibiótico: cloranfenicol) , pH levemente ácido (5,6) que inhibe algunas bacterias	Selectivo. No es diferencial. Inhibidor.	Aislamiento de hongos patógenos dermatofitos .	-----
Roiron	Líquido: peptona, extracto de levadura, maltosa, L-cisteína, ácido ascórbico, penicilina G sódica y estreptomycin a	Selectivo	Medio selectivo para el aislamiento, cultivo e identificación de <i>Trichomonas vaginalis</i> . También para aislamiento e identificación de especies de <i>Candida</i>	

Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para el desarrollo de los microorganismos que pretendemos detectar, y debe estar exento de todo microorganismo contaminante. La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añaden otros componentes.

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de los medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.

En los diferentes medios de cultivo sólidos, semisólidos o líquidos, se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, vitaminas, extractos de levadura y carne, entre otros.

Los hidratos de Carbono se adicionan por dos motivos fundamentales, para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos.

El suero, la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

Las vitaminas y extractos de levaduras para promover el crecimiento de los microorganismos.

También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras (el rojo fenol se usa como indicador ya que es rojo a pH básico y amarillo a pH ácido; el violeta de genciana se usa como inhibidor ya que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas).

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial el crecimiento se debe dar en condiciones determinadas de temperatura, grado de humedad, luz y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad.

### **Medios de cultivo generales**

Permiten la recuperación de microorganismos sin condiciones especiales de crecimiento.

#### *Agar sangre (BBL Columbia Agar with 5% Sheep Blood; BD)*

Agar Columbia con 5% de sangre de oveja es un medio de cultivo sólido de uso general altamente nutritivo utilizado para el crecimiento

y la recuperación de las especies microbianas no exigentes y exigentes de una variedad de material clínico y no clínico.

La sangre de oveja permite la detección de reacciones hemolíticas y suministra el factor X (hemina) necesario para el crecimiento de muchas especies bacterianas, pero carece de factor V (nicotinamida adenina dinucleótido, NAD) ya que contiene NADasa que destruye el NAD. Por esta razón, *H. influenzae* y *Neisseria*, que requieren los factores X y V no crecerán en este medio.

Puesto que muchos patógenos requieren dióxido de carbono en el aislamiento primario, las placas se pueden incubar en una atmósfera que contiene aproximadamente 3-10% de CO<sub>2</sub>.

Después de la incubación, la mayoría de las placas mostrarán un área de crecimiento confluyente. Debido a que el procedimiento de formación de rayas durante la siembra es, en efecto, una técnica de dilución, se depositan cantidades decrecientes de microorganismos en las áreas rayadas. En consecuencia, una o más de estas áreas deben exhibir colonias aisladas de los organismos contenidos en la muestra. Además, el crecimiento de cada organismo puede ser semicuantitativamente anotado en base al crecimiento en cada una de las áreas con rayas. Dado que el número de bacterias patógenas es grande, no se dan detalles sobre su apariencia. Para la identificación, los organismos deben estar en cultivo puro y se deben realizar pruebas morfológicas, bioquímicas y / o serológicas para la identificación final.

### Medios enriquecidos

Permiten la recuperación de microorganismos exigentes.

*Agar Chocolate II (BBL GC II Agar with Hemoglobina and IsoVitaleX; BD)*

Chocolate II Agar es un medio sólido enriquecido para el cultivo de microorganismos exigentes, en especial las especies *Neisseria* y *Haemophilus*.

Carpenter y Morton describieron un medio mejorado para el aislamiento de gonococos en 24 h (Carpenter y Morton, 1947). La eficacia del medio, agar GC suplementado con hemoglobina y

concentrado de levadura, fue demostrada en un estudio de doce medios utilizados en aquella época para el aislamiento de este organismo (Carpenter y col., 1949). BBL mejoró el medio al reemplazar el concentrado de levadura con enriquecimiento IsoVitaleX, un suplemento de definición química desarrollado específicamente para facilitar el crecimiento de los gonococos, aunque presenta amplia aplicación con otros organismos, por ejemplo, *Haemophilus* (Power y McCuen, 1988).

Así Agar Chocolate II contiene una base de agar GC II mejorado, hemoglobina bovina y enriquecimiento IsoVitaleX. La base GC contiene nutrientes nitrogenados en forma de caseína y peptonas de carne, tampón de fosfato para mantener el pH y almidón de maíz, que neutraliza los ácidos grasos tóxicos que pueden estar presentes en el agar. La hemoglobina proporciona el factor X (hemina) para la especie *Haemophilus*. El enriquecimiento IsoVitaleX es un suplemento definido que proporciona el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido, NAD) para la especie *Haemophilus*, además de vitaminas, aminoácidos, coenzimas, dextrosa, iones férricos y otros factores que favorecen el crecimiento de la *Neisseria* patógena.

La morfología característica de las colonias en Agar Chocolate II es la siguiente:

- \* *H. influenzae*: pequeñas (1 mm), húmedas, nacaradas con un olor a “ratón” característico.
- \* *N. gonorrhoeae*: pequeñas, de color blanco grisáceo a incoloro, mucoides.

El diagnóstico presuntivo de la gonorrea se basa en la observación de diplococos intracelulares gram negativos en frotis para tinción de gram de flujos uretrales en hombres y de secreciones endocervicales en mujeres; crecimiento de *N.gonorrhoeae* de la uretra (hombres) o del endocérnix en medios de cultivo selectivos; y/o detección de *N.gonorrhoeae* con pruebas de laboratorio sin cultivo. El diagnóstico definitivo de la gonorrea requiere el aislamiento de la *N.gonorrhoeae* de los puntos de exposición por cultivo (cultivos de 48-72 horas en medios selectivos), demostración de la morfología colonial típica, prueba oxidasa positiva, y la confirmación de los aislados de cultivo

de *N.gonorrhoeae* mediante métodos de identificación específicos (producción de ácidos de carbohidratos, pruebas rápidas por enzimas, ensayos serológicos, pruebas de ácidos nucleicos específicos). El cultivo es necesario para la posterior determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.

\* *Neisseria meningitidis*: medianas a grandes, gris azulado, mucoides.

\* *Streptococcus pneumoniae*: pequeñas, brillantes y planas que muestran una decoloración verde en el medio.

*Medio Schaedler (BBL™ Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood)*

Agar Schaedler con Vitamina K1 y 5% de sangre de oveja es un medio sólido altamente nutritivo para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaeróbicos exigentes.

En 1965, Schaedler y col. desarrollaron el medio base, sin inhibidores, la versión original del medio denominado Agar Schaedler. Fue formulado para apoyar el crecimiento de microorganismos anaeróbicos exigentes tales como lactobacilos, estreptococos, clostridios y Bacteroides. Mata y col. en 1969, estudiando la microbiota fecal en personas sanas en Centroamérica, modificaron el Agar Schaedler para producir una serie de nuevas formulaciones. Las modificaciones en el medio basal de Schaedler incluyeron ajustes en el contenido de peptona, ya que el caldo de soja tripticasa se sustituyó por el componente peptona tripticasa de la formulación original, y el aumento en el contenido de cloruro de sodio. Además, se redujo la concentración de dextrosa para evitar la interferencia con las reacciones hemolíticas y se redujo el nivel de extracto de levadura para evitar el oscurecimiento del medio (MacFaddin). La inclusión de vitamina K1 es una modificación adicional y se añadió ya que es un requisito de crecimiento para algunas cepas de *Prevotella melaninogenica* y *Porphyromonas pigmentadas* (Gibbons y MacDonald, 1960) y también aumenta el crecimiento de algunas cepas de Bacteroides y gram positivos no esporuladores (Finegold y col., 1974).

Los aerobios y los anaerobios exigentes crecen bien en este medio y el tipo de organismos recuperados depende del ambiente utilizado en

el proceso de incubación (aeróbico, aeróbico suplementado con dióxido de carbono o condiciones anaeróbicas).

Con el fin de determinar la relación con el oxígeno de cada tipo de colonia presente en el medio Schaedler sólido anaeróbico, se inocula también la muestra en los siguientes medios:

a. Una placa de agar de sangre anaerobio incubada anaeróbicamente.

b. Una placa de agar de sangre aerobia (o agar chocolate) para incubarse en una atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono. El agar de chocolate es particularmente necesario para distinguir las especies de *Haemophilus* nutricionalmente exigentes y otras bacterias que crecerán sobre agar sangre anaerobia incubado anaeróbicamente y sobre agar chocolate bajo una mayor tensión de dióxido de carbono pero que no crecen en agar sangre en presencia de dióxido de carbono o en aire.

c. Una placa de agar sangre aeróbica para ser incubada aeróbicamente sin añadir dióxido de carbono.

d. Tubos de Tioglicolato enriquecido y un tubo de peptonas en Agar Sabouraud glucosa.

Incubar todos los cultivos a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  durante un mínimo de 24 h y hasta 7 días. Registrar la relación con el oxígeno como anaerobio obligado o no anaerobio (anaerobios aerotolerantes, microaerófilos o anaerobios facultativos).

Las colonias anaerobios obligatorios pueden estudiarse más a fondo utilizando los cultivos correspondientes. Los organismos que no crecen en las placas de subcultivo aeróbico pueden presumirse obligatoriamente anaeróbicos en cuanto a sus requerimientos de oxígeno.

Para la identificación, los organismos deben estar en cultivo puro. Se pueden realizar pruebas bioquímicas para la identificación completa.

*Medio Tioglicolato (BBL™ Thioglycollate Medium, Enriched (with Vitamin K1 and Hemin), with Calcium Carbonate)*

El medio de tioglicolato enriquecido con carbonato de calcio es un medio líquido de tioglicolato sin indicador 135C suplementado con vitamina K1 y hemina (Brewer, 1940; Vera, 1944; Dowell y Hawkins, 1987). Se recomienda para uso en el aislamiento y cultivo de microorganismos obligatoriamente anaerobios exigentes o de crecimiento lento presentes en muestras clínicas (Dowell y col., 1977; Forbes y Granato 1995). También se recomienda para el aislamiento y el cultivo de una amplia variedad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. El medio se prepara con un espacio anaeróbico. La vitamina K1 y la hemina han demostrado ser requeridas por ciertos anaerobios para el crecimiento (Gibbons y MacDonald, 1960; Wilkins y col., 1976). El carbonato de calcio mejora el mantenimiento del cultivo mediante la neutralización de ácidos producidos durante el crecimiento (Reischelderfer y Mangels, 1994).

El crecimiento se demuestra por la aparición de turbidez cuando se compara con un control no inoculado. Si se detecta crecimiento, los cultivos deben ser examinados mediante tinción de Gram y subcultivados en placas con medios selectivos y no selectivos. Si se sospecha anaerobios, también se deben hacer subcultivos en medios anaeróbicos apropiados.

Una limitación de este medio es que los anaerobios pueden ser cubiertos por organismos facultativos de crecimiento rápido. Si el medio no revela crecimiento se debe realizar un gram del medio. Nunca se debe confiar en este medio exclusivamente para el aislamiento de anaerobios ya que algunos anaerobios pueden ser inhibidos por productos metabólicos o ácidos producidos a partir de anaerobios facultativos de crecimiento más rápido.

### **Medios selectivos**

En el protocolo se utilizan para el aislamiento de protozoos y levaduras.

*Agar Sabouraud con cloranfenicol (Sabouraud Agar with Chloramphenicol; BD)*

Agar Sabouraud glucosa es un medio de uso general originalmente ideado para el cultivo de dermatofitos (Sabouraud, 1892). Hoy en día se utiliza para el aislamiento y cultivo de todos los hongos (Ajello y col., 1963; MacFaddin, 1985; Sutton, 2003). Las peptonas en Agar Sabouraud glucosa son fuente de factores de crecimiento nitrogenados. La glucosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos. La alta concentración de glucosa proporciona una ventaja para el crecimiento de los hongos (osmóticamente estables) mientras que la mayoría de las bacterias no toleran la alta concentración de azúcar. Además, el pH bajo es óptimo para los hongos, pero no para muchas bacterias. Agar Sabouraud glucosa sólo es ligeramente selectivo contra las bacterias.

El BD Agar Sabouraud con Cloranfenicol es un medio selectivo basado en el Agar Sabouraud glucosa. Se han añadido agentes selectivos para inhibir las bacterias. El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro inhibidor de una amplia gama de bacterias gram negativas y gram positivas, pero puede tener un efecto inhibitorio sobre varios hongos patógenos (MacFaddin, 1985). Se utiliza para el aislamiento de hongos de especímenes clínicos o materiales sospechosos de contener contaminantes bacterianos.

Es por ello, que paralelamente también se utiliza un medio no selectivo como Agar Columbia con 5% de sangre de oveja para proporcionar una indicación de patógenos bacterianos presentes en la muestra.

Después de una incubación suficiente, las placas pueden mostrar colonias aisladas en áreas estriadas y crecimiento confluyente en áreas de gran inoculación. Se examinan las placas para buscar las colonias de hongos que exhiben el color y la morfología típicos. Se deben realizar pruebas bioquímicas y procedimientos microscópicos y serológicos para confirmar los hallazgos. Dado que el número de hongos patógenos es grande, no se dan detalles sobre su apariencia.

#### *Medio de Roiron modificado*

La detección de *T.vaginalis* en especímenes clínicos por medio de la observación en fresco tiene una sensibilidad muy baja ( $\leq 50\%$ ) por lo que se recomienda su cultivo y aislamiento en medio líquido



(Roiron o Diamond) para incrementar la sensibilidad (>90%) (Kupferberg y col., 1948; Kean y Day, 1954), no considerándose realizar la prueba mediante NAAT (Horner y col., 2016).

Este medio es un buen soporte para el crecimiento de hongos y levaduras, por ello puede utilizarse en el aislamiento e identificación de especies de *Candida* (Feinberg y Whittington, 1957). La composición del medio es muy rica en nutrientes (Peptona, extracto de levadura, maltosa, L-cisteína, ácido ascórbico) y los antibióticos utilizados como inhibidores del crecimiento bacteriano son la Penicilina G sódica y la Estreptomina.

El medio de cultivo se utiliza en tubo con tapón de rosca y fondo cónico, que aumenta la seguridad en el laboratorio y está listo para su inoculación.

Es un medio fundamentalmente anaerobio por lo que la siembra debe hacerse directamente en el fondo del tubo, siempre con la precaución de haber atemperado previamente el medio de cultivo. El crecimiento de tricomonas debe revisarse diariamente, por observación microscópica en fresco (400x), tomando las muestras del fondo del tubo. El periodo óptimo de incubación es de dos a cinco días.

En caso de positividad e instauración de tratamiento, se recomienda procesar una segunda muestra a la semana después de iniciar la terapia antiprotzoaria. Si este cultivo fuese negativo, se tomaría un segundo cultivo dos a tres semanas después y solo si éste fuera negativo, se consideraría que la terapia ha tenido éxito.

### **Cultivo de microorganismos con requerimientos especiales.**

*M.genitalium/hominis* y *U.urealyticum/parvum*

El cultivo de micoplasmas genitales es más complejo y requiere el uso de medios de enriquecimiento y especiales para este tipo de microorganismos. Frecuentemente se utilizan galerías comerciales especialmente diseñadas para la selección e identificación de este grupo de bacterias.

En el hombre, la muestra adecuada para el estudio de uretritis o prostatitis es la torunda uretral. En la mujer, las muestras vaginales

son más adecuadas para la recuperación de *M.hominis* y *Ureaplasma spp* que las de endocérnix, fórnix posterior o uretra para estudios de vaginosis.

La detección de micoplasmas genitales puede realizarse mediante cultivo en medios de enriquecimiento. El crecimiento de los micoplasmas requiere una base nutritiva a base de peptonas, suero, factores de crecimiento (cisteína, PolyVitex, arginina, urea), y antibiótico que inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas, incubados en microaerofilia a 37° C. Los cultivos deben revisarse durante 5-7 días.

El caldo 10B de Shepard, y el caldo urea-arginina pueden ser utilizados para aislar *M.hominis* y *Ureaplasma spp*. El agar A7 y modificaciones del mismo (A7B, A8) permiten el crecimiento de *M.hominis* y *U.urealyticum* diferenciándose por la morfología de la colonia. *M.hominis* crece en colonias incoloras en forma de “huevos fritos”. Por su parte, *U.urealyticum* forma colonias de color marrón oscuro con morfología típica de “erizo de mar” pasando el agar circundante de amarillo a rojo por cambio de pH del rojo fenol del medio (Acosta y col., 2011).

#### *C.trachomatis* y *N.gonorrhoeae*

El cultivo de *Chlamydias* requiere del uso de cultivos celulares y no suele practicarse de rutina.

A diferencia de *N.gonorrhoeae* que se recupera bien en los cultivos estándar, el cultivo de *C. trachomatis* es laborioso y suele realizarse exclusivamente en centros de referencia. Ahora bien, en general, las técnicas comerciales destinadas a la detección molecular de *C. trachomatis* detectan simultáneamente *N. gonorrhoeae*.

Hasta hace poco el cultivo celular de *C.trachomatis* fue el estándar de referencia para su diagnóstico. Pero debido a su baja sensibilidad (60-80%), a ser un método laborioso difícil de estandarizar que requiere especial capacitación técnica y varios días de incubación (3-7 días), así como no ser útil para un gran número de muestras, y debido a la aparición de nuevos métodos diagnósticos más fáciles de implementar, rápidos y sensibles (NAAT), el cultivo celular

ha quedado relegado a laboratorios de referencia, con utilidad en estudios epidemiológicos y/o forenses.

El cultivo se realiza en líneas celulares HeLa 229 y McCoy. Presenta la ventaja frente a las técnicas moleculares basadas en ADN, de solo detectar bacterias vivas, pero es también un inconveniente, pues al ser una bacteria muy lábil, las condiciones de transporte deben de ser excelentes, garantizando que no se pierda la cadena de frío y utilizando un medio adecuado. Otra ventaja del cultivo celular, es la posibilidad de realizar estudios de resistencia a antimicrobianos (Alonso y col., 2012).

#### *Cultivo de virus*

El diagnóstico microbiológico de la infección por VPH, se realiza por técnicas moleculares ya que son virus no cultivables y la realización de serología para detección de anticuerpos no aporta información sobre el genotipo del virus al utilizar un antígeno común (Aznar Martín y col., 2007; Mateos y col., 2016).



Anexo 2. RECOGIDA DE MUESTRAS DE SEMEN Y ORINA  
“PROTOCOLO ESTUDIO PREVIO TRHA” (técnica de Meares-Stamey modificada)

RECOGIDA DE MUESTRAS DE SEMEN Y ORINA  
“PROTOCOLO ESTUDIO PREVIO TRHA” (técnica de Stamey modificada)

Para hacer un buen diagnóstico microbiológico lo fundamental es la obtención de una muestra libre de microbiota contaminante de la piel. Para ello utilizar el método que se describe a continuación:

- Debe tener de 2 a 7 días de abstinencia sexual antes de la obtención de las muestras.
  - o El día anterior a la recogida de las muestras, beber abundante agua para asegurar una “limpieza” de la uretra.
- **MUY IMPORTANTE: durante la recogida de las muestras mantenga en todo momento las condiciones de higiene para evitar contaminación de las mismas.**
- Preparar los **4 frascos estériles** (3 para orina y uno para el semen) para la recogida de las muestras, escribiendo tanto en el frasco como en la tapa **O1, O2, SE y O3**. Abrir los 4 frascos retirando la tapa.
- Lavado y desinfección de las manos y del pene (aparato genital masculino):
  - o Lavar las manos con agua tibia y jabón antiséptico dos a tres veces.
  - o Lavar muy bien la parte de arriba del pene (prepucio, glande, surco de la corona del glande y meato urinario, retirando totalmente hacia atrás el prepucio) con agua tibia y jabón antiséptico. Eliminar muy bien el jabón con abundante agua y posteriormente secar el pene con unas gasas estériles. Posteriormente limpiar dos a tres veces con alcohol del 70%.
- El paciente debe orinar (habiendo orinado por última vez 4 horas antes o más; sino sería necesario beber 400 ml de líquido, o sea 2 vasos) y recoger la orina de la siguiente forma:

- Tenga preparado el frasco O1 y el O2 (**importante:** no tocar las paredes interiores de los frascos de recogida).
- Empiece a orinar y recoja el **primer chorro de orina** (10 a 15 ml) para examen bacteriológico (frasco estéril): frasco número 1 (rotulado como **O1**). Retire el frasco del chorro de orina y sin parar siga orinando en el váter unos 100-200 ml de orina.
- Sin parar de orinar coloque el frasco O2 debajo del chorro de orina y recoja el **chorro medio de orina** (10 a 15 ml) para examen bacteriológico (frasco estéril): frasco número 2 (rotulado como **O2**). Parar de orinar y cerrar los dos frascos.
- **Importante:** no vaciar totalmente la vejiga.
- Seguidamente y antes de recoger el semen, lavar el pene y desinfectar las manos y glande con alcohol del 70%:
  - Tras para de orinar, lavar las manos con agua tibia y jabón antiséptico.
  - Realizar un aseo completo y cuidadoso del meato urinario, el glande, del surco balano prepucial y del prepucio.
  - Tras el secado, el meato y el glande son desinfectados dos o tres veces con un hisopo/gasa empapado en alcohol del 70%.
  - Desinfectar las manos con una solución antiséptica o con alcohol al 70%.
- Ahora, obtener la **muestra de semen** por masturbación directa en el frasco de recogida estéril SE y de un solo uso (**MUY IMPORTANTE:** no utilizar lubricantes tipo vaselina, saliva, etc., durante la masturbación): frasco número 3 (**importante:** no tocar las paredes interiores del frasco de recogida). Nunca recoger la muestra de semen practicando coitus interruptus (marcha atrás) o mediante felación (sexo oral). Asegurarse de que el frasco queda bien rotulado como **SE** y cerrarlo.
- Por último, recoger el **primer chorro de orina (10 a 15 ml) obtenida inmediatamente después del eyaculado** (frasco

estéril): frasco número 4 (rotulado como **O3**). Cerrar bien los 4 frascos.

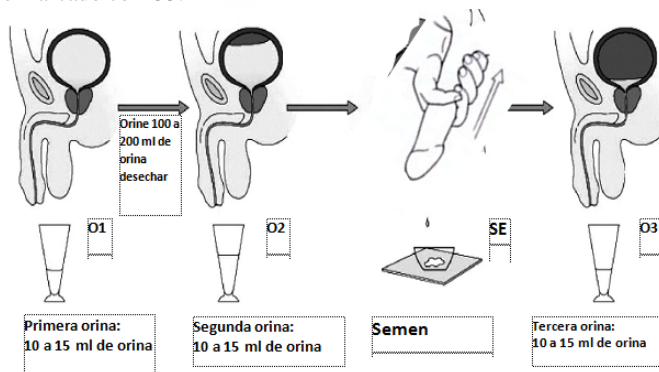
Las 4 muestras deben ser transportadas en posición vertical (tapa hacia arriba) inmediatamente al laboratorio de Microbiología, e intentar sembrarlas en un plazo máximo de 3 horas después de la eyaculación.

**Si tiene alguna duda consulte a la Unidad de Reproducción o al Servicio de Microbiología.**



## ESQUEMA DE RECOGIDA DE LAS 4 MUESTRAS PARA CULTIVO MICROBIOLÓGICO

1. Aproximadamente 30 minutos antes de recoger las muestras, el paciente debe beber 400 ml de líquido (dos vasos). La prueba empieza cuando el paciente desea orinar.  
**NOTA:** en caso de realizar la recogida a primera hora de la mañana y no haya orinado en toda la noche, no es necesario beber antes de iniciar la recogida de las muestras.
2. Quite las tapas de los cuatro envases estériles para las muestras, marcados con O1, O2, S y O3. Coloque los envases para muestras destapados en una superficie plana y mantenga la esterilidad.
3. Lávese las manos con agua tibia y jabón antiséptico dos a tres veces.
4. Exponga el pene y retraiga el prepucio (piel de la punta del pene) para exponer el glande (punta del pene). El prepucio ha de retraerse en su totalidad.
5. Lávese muy bien la parte de arriba del pene (prepucio, glande, surco de la corona del glande y meato urinario, retirando totalmente hacia atrás el prepucio) con agua tibia y jabón antiséptico. Eliminar muy bien el jabón con abundante agua y posteriormente secar el pene con unas gasas estériles. Posteriormente limpiar dos a tres veces con alcohol del 70%
6. Orine 10 a 15 ml en el primer envase marcado con O1.
7. Orine 100 a 200 ml en la taza del váter o en un vaso y, sin interrumpir el chorro de orina, orine 10 a 15 ml en el segundo envase marcado con O2.
8. Seguidamente y antes de recoger el semen, lavar el pene y desinfectar las manos y glande con alcohol del 70%:
  - a. Tras para de orinar, lavar las manos con agua tibia y jabón antiséptico.
  - b. Realizar un aseo completo y cuidadoso del meato urinario, el glande, del surco balano prepucial y del prepucio.
  - c. Tras el secado, el meato y el glande son desinfectados dos o tres veces con un hisopo/gasa empapado en alcohol del 70%.
  - d. Desinfectar las manos con una solución antiséptica o con alcohol al 70%.
9. El paciente realiza masturbación, se inclina hacia delante y sostiene el envase para muestras estéril marcado como S para recoger la muestra de semen.
10. Inmediatamente después de recoger el semen, el paciente orina 10 a 15 ml en el envase marcado con O3.



Modificado de Naber, KG y Weidner, W; 1999.



Anexo 3. Hoja de información y consentimiento informado  
DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS  
INFECCIONES DEL TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO  
(ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (castellano)

**HOJA DE INFORMACIÓN (castellano)**

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** DESARROLLO DE UN  
PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS INFECCIONES DEL  
TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO (ITREM) EN  
REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA.

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Ernesto Veiga Álvarez\*

**INVESTIGADORES SECUNDARIOS:** Dr. Benito José  
Regueiro García\*\*, Dra. Mercedes Treviño Castellano\*\* y Dr.  
Manuel Macía Cortiñas\*.

**CENTRO:** \*Unidad de Reproducción Humana Asistida (URHA) y  
\*\*Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de  
Santiago (CHUS).

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un  
**estudio de investigación** en el que se le invita a participar. Este  
estudio fue aprobado por el Comité territorial de Ética de la  
Investigación de Lugo y Santiago.

Si decide participar en el mismo, debe recibir información  
personalizada del investigador, **leer antes este documento** y  
hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles  
sobre el mismo. Si así lo desea, puede llevar el documento,  
consultarlo con otras personas, y tomar el tiempo necesario para  
decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Ud.  
puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de  
parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin

tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con el médico ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

### **¿Cuál es el propósito del estudio?**

El diagnóstico de la esterilidad masculina se basa habitualmente en la normalidad del análisis del semen pero la causa más importante de esterilidad masculina es la Infección del Tracto Reproductivo Masculino (ITREM).

El proceso infeccioso puede afectar a la fertilidad por diferentes mecanismos.

Dado que actualmente no está totalmente claro si los microorganismos encontrados en el semen necesariamente significa infección y si contribuyen de forma importante a la esterilidad masculina, el objetivo principal del presente trabajo es el de establecer un protocolo de estudio diagnóstico de las ITREM utilizando para ello los estudios microbiológicos mediante análisis citológicos, métodos de cultivo y las más recientes técnicas moleculares; sin olvidarnos del apoyo de la sintomatología clínica, para detectar con la mayor sensibilidad posible, cualquier ITREM que pueda afectar al espermatozoide y, sobre todo a su carga genética que sea tratable y, de esta forma, mejorar los resultados de los tratamientos de reproducción asistida.

Es por ello que se precisa la participación de hombres que estén siendo estudiados junto con su pareja por esterilidad y la recogida de muestras de orina y semen para su estudio. Además, como uno de los datos clínicos que es necesario estudiar en este trabajo, proviene de la historia clínica de la mujer, a ella, en calidad de su pareja también se le incluye en el presente consentimiento.

### **¿Por qué me ofrecen participar a mí?**

Ud. es invitado a participar porque está siendo estudiado/tratado en la URHA-CHUS.

### **¿En qué consiste mi participación?**

Su participación en el estudio implicará que los investigadores:

1. Puedan consultar los datos de su historial clínico.
2. Realización de un cuestionario por usted mismo relativo a posibles síntomas de prostatitis (NIH-CPSI versión en español).
3. Le sea realizada una consulta donde se le explicará como recoger las muestras de orina y semen.
4. Entrega al laboratorio de Microbiología de tres muestras de orina y una de semen para la investigación de la presencia de microorganismos (bacterias, hongos, protozoos o virus).
5. Los análisis a realizar en las muestras de orina serán:
  - a. Observación microscópica directa en fresco de la orina y/o semen al microscopio.
  - b. Preparación de las muestras de orina y/o semen en un soporte de vidrio para poder teñir las células y microorganismos presentes en las mismas.
  - c. Cultivo de las muestras para la detección de microorganismos.
  - d. Realización de técnicas de biología molecular para la detección de microorganismos.
6. En caso de ser positivo (infección) el análisis de las muestras de orina y/o semen, posibilidad de contactar con usted para instaurar tratamiento y para repetir la toma de muestras tras el tratamiento para confirmar que el tratamiento ha sido efectivo. En caso de curación, repetición del cuestionario.

Excepto la realización del cuestionario, todos los demás procedimientos forman ya parte de nuestra práctica asistencial habitual en la URHA-CHUS para todo aquel paciente que vaya a realizar Tratamientos de Reproducción Humana Asistida. Es por ello que su participación en el estudio le supondrá dedicar solamente unos 10-20 minutos adicionales para cubrir el cuestionario.

Para la mujer, simplemente consiste en dar su consentimiento a entrar en su historia clínica a recoger el dato clínico necesario.

El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o interrumpir su participación. En todo caso se le informará de los motivos de su retirada.

### **¿Qué molestias o inconvenientes tiene?**

Es necesario indicarle las pruebas que se le van a hacer, qué molestias le puede ocasionar, pero que efectivamente estas molestias son las mismas que las que sufre cuando es tratado, puesto que este estudio sigue la práctica clínica habitual.

Su participación en el estudio no implica molestias adicionales a las de la práctica asistencial habitual.

### **¿Obtendré algún beneficio por participar?**

No se espera que usted obtenga beneficio directo por participar en el estudio además del que se desprenda de tratarle una ITREM en caso de que exista y el protocolo sea capaz de detectarla. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre las ITREM en Reproducción Humana Asistida. Esta información podrá ser además de utilidad en un futuro para otras parejas que sean tratadas de esterilidad.

### **¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?**

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

También podrá recibir los resultados de las pruebas que se realicen con sus muestras si así lo solicita dirigiéndose al investigador. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el responsable del estudio.

### **¿Se publicarán los resultados de este estudio?**

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

### **¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos y muestras?**

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

Solo el equipo investigador, y el personal del SERGAS, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se puede transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa de nuestro país.

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados hasta finalizar el estudio de modo:

- **Codificados**, que quiere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

y al finalizar el estudio serán:

- **Anonimizados**, es decir, que se rompió todo vínculo que pueda identificar a la persona donante de los datos, no pudiendo ser identificado ni siquiera por el equipo investigador.

El responsable de la custodia de los datos y muestras es **Ernesto**

**Veiga Álvarez**, y el lugar de realización de los análisis previstos en este estudio es el Servicio de Microbiología del CHUS.

Al terminar el estudio, conforme al RD 1716/2011, sus muestras biológicas serán:

- ***Destruídas***

### **¿Existen intereses económicos en este estudio?**

Esta investigación es promovida por personal del SERGAS con los Recursos que de forma habitual aporta el SERGAS para el estudio y tratamiento de las parejas estériles que son tratadas en la URHA-CHUS.

Los investigadores no recibirán retribución específica por la dedicación al estudio.

Usted, ni su pareja serán retribuidos por participar.

### **¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?**

Usted puede contactar con **Ernesto Veiga Álvarez** en el teléfono 981955311 o en el correo electrónico [Ernesto.Veiga.Alvarez@sergas.es](mailto:Ernesto.Veiga.Alvarez@sergas.es)

**Muchas gracias por su colaboración.**

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN “DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO (ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA”.**

Yo, \_\_\_\_\_

- 
- ☐ *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con: Ernesto Veiga Álvarez y hacer todas las preguntas sobre el estudio necesarias.*
  - ☐ *Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.*
  - ☐ *Accedo a que se utilicen mis datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
  - ☐ *Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.*

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio al terminar el mismo, conforme al RD 1716/2011, serán:

- ***Destruídas***

Fdo.: El participante,

Fdo.: Pareja

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Fdo.: El investigador que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS  
PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO DE  
INVESTIGACIÓN “DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE  
ESTUDIO DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO  
REPRODUCTIVO MASCULINO (ITREM) EN  
REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA”.**

*(para los casos en los que el participante no pueda leer/escribir)*

*El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador*

*Yo*

---

*como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:*

- ☐ *Se le leyó a \_\_\_\_\_ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.*
- ☐ *Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- ☐ *Accede a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- ☐ *Presta libremente su conformidad para participar en este estudio.*

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio conforme al RD 1716/2011:

- ***No accedió a que sean conservadas una vez terminado el estudio.***

Fdo.: El/la testigo

Fdo.: El investigador  
que solicita el  
consentimiento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_



**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN “DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO (ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA”.**

Yo, \_\_\_\_\_, representante legal de \_\_\_\_\_:

- ☐ *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con Ernesto Veiga Álvarez y hacer todas las preguntas sobre el estudio.*
- ☐ *Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- ☐ *Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- ☐ *Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.*

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio conforme al RD 1716/2011:

- ***No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio.***

Fdo.: El/la representante legal,

Fdo.: El investigador  
que solicita el  
consentimiento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:



Anexo 4. Folla de información e consentemento informado  
DESARROLLO DUN PROTOCOLO DE ESTUDO DAS  
INFECCIÓN DO TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO  
(ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (galego)

**FOLLA DE INFORMACIÓN (galego)**

**TÍTULO DO ESTUDO:** DESARROLLO DUN PROTOCOLO DE  
ESTUDO DAS INFECCIÓN DO TRACTO REPRODUCTIVO  
MASCULINO (ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA  
ASISTIDA

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Ernesto Veiga Álvarez\*

**INVESTIGADORES SECUNDARIOS:** Dr. Benito José Regueiro  
García\*\*, Dra. Mercedes Treviño Castellano\*\* y Dr. Manuel  
Macía Cortiñas\*.

**CENTRO:** \*Unidad de Reproducción Humana Asistida (URHA) y  
\*\*Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de  
Santiago (CHUS).

Este documento ten por obxeto ofrecerlle información sobre un  
**estudo de investigación** no que se lle invita a participar. Este estudo  
foi aprobado polo Comité de Ética da Investigación de  
.....

Se decide participar no mesmo, debe recibir información  
personalizada do investigador, **ler antes este documento** e facer todas  
as preguntas que precise para comprender os detalles sobre o mesmo.  
Se así o desexa, pode levar o documento, consúltalo con outras  
persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.  
A participación neste estudo é completamente **voluntaria**. Vd. pode  
decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer  
retirando o consentimento en calquera momento sen obriga de dar  
explicacións. Asegurámoslle que esta decisión non afectará á relación  
co seu médico nin á asistencia sanitaria á que Vd. ten dereito.

### **Cal é o propósito do estudo?**

O diagnóstico da esterilidade masculina baséase habitualmente na normalidade da análise do seme pero a causa máis importante de esterilidade masculina é a ITREM. O proceso infeccioso pode afectar á fertilidade por diferentes mecanismos. Dado que actualmente non está totalmente claro se os microorganismos encontrados no seme necesariamente significa infección e se contribúen de forma importante á esterilidade masculina, o obxectivo principal do presente traballo é o de establecer un protocolo de estudo diagnóstico das ITREM utilizando para iso os estudos microbiolóxicos mediante análises citolóxicas, métodos de cultivo e as máis recentes técnicas moleculares; sen esquecesenos o apoio da sintomatoloxía clínica, para detectar coa maior sensibilidade posible, calquera ITREM que poida afectar ao espermatozoide e, sobre todo á súa carga xenética que sexa tratable e, desta forma, mellorar os resultados dos tratamentos de reprodución asistida.

É por iso que se precisa a participación de homes que estean a ser estudados xunto coa súa parella por esterilidade e a recollida de mostras de ouriños e seme para o seu estudo.

### **Por que me ofrecen participar a min?**

Vostede é convidado a participar porque está sendo estudado/tratado na URHA-CHUS.

### **En que consiste a miña participación?**

A súa participación no estudo implicará que os investigadores:

1. Poidan consultar os datos do seu historial clínico e o da súa parella.
2. Realización dun cuestionario por vostede mesmo relativo a posibles síntomas de prostatite (NIH-CPSI versión en español).
3. Séxalle realizada unha consulta onde se lle explicará como recoller as mostras de ouriños e seme.
4. Entrega ao laboratorio de Microbioloxía de tres mostras de ouriños e unha de seme para a investigación da presenza de microorganismos (bacterias, fungos, protozoos ou virus).
5. As análises a realizar nas mostras de ouriños serán:

a. Observación microscópica directa en fresco dos ouriños e/ou seme ao microscopio.

b. Preparación das mostras de ouriños e/ou seme nun soporte de vidro para poder tinguir as células e microorganismos presentes nestas.

c. Cultivo das mostras para a detección de microorganismos.

d. Realización de técnicas de bioloxía molecular para a detección de microorganismos.

6. En caso de ser positivo (infección) a análise das mostras de ouriños e/ou seme, posibilidade de contactar con vostede para instaurar tratamento e para repetir a toma de mostras tras o tratamento para confirmar que o tratamento foi efectivo. En caso de curación, repetición do cuestionario.

Agás a realización do cuestionario, todos os demais procedementos forman xa parte da nosa práctica asistencial habitual na URHA-CHUS para todo aquel paciente que vaia realizar Tratamentos de Reprodución Humana Asistida. É por iso que a súa participación no estudo lle supoñerá dedicar soamente uns 10-20 minutos adicionais para cubrir o cuestionario.

O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interromper a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada.

### **Que molestias ou inconvenientes ten?**

A súa participación non implica molestias adicionais as da practica asistencial habitual.

### **Obtereire algún beneficio por participar?**

Non se espera que vostede obteña beneficio directo por participar no estudo ademais do que se desprenda de tratalo dunha ITREM en caso de que exista e o protocolo sexa capaz de detectala. A investigación pretende descubrir aspectos descoñecidos ou pouco claros sobre as ITREM en Reprodución Humana Asistida. Esta información poderá

ser ademais de utilidade nun futuro para outras parellas que sexan tratadas de esterilidade.

### **Recibirei a información que se obteña do estudo?**

Se Vd. o desexa, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo. Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras se así o solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispor deles, deberían ser comentados co médico do estudo.

### **Publicaranse os resultados deste estudo?**

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

### **Como se protexerá a confidencialidade dos meus datos e mostras?**

O tratamento, comunicación e cesión dos seus datos farase conforme ao disposto pola Lei Orgánica 15/1999, de 13 de decembro, de protección de datos de carácter persoal.

So equipo investigador, e o persoal do SERGAS, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Poderase transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Os seus datos e mostras biolóxicas serán recollidos e conservados até rematar o estudo de modo:

- **Codificados**, *que quere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.*

y al finalizar el estudio serán:

**Anonimizados**, *e dicir, que se rompeu todo vínculo que poida identificar a persoa doante dos datos, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.*

O responsable da custodia dos datos e mostras é **Ernesto Veiga Álvarez**, e o lugar de realización dos análises previstos neste estudo é o Servizo de Microbioloxía do CHUS.

Ao rematar o estudo, conforme ao RD 1716/2011, as súas mostras biolóxicas serán:

- ***Destruídas***

**Existen intereses económicos neste estudo?**

Esta investigación é promovida por persoal do SERGAS con fondos que de forma habitual aporta o SERGAS para o estudo e tratamento das parellas estériles que son tratadas na URHA-CHUS.

O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo.

Vd., nin a súa parella serán retribuídos por participar.

**Como contactar co equipo investigador deste estudo?**

Vd. pode contactar con Ernesto Veiga Álvarez no teléfono 981955311 ou enderezo electrónico [Ernesto.Veiga.Alvarez@sergas.es](mailto:Ernesto.Veiga.Alvarez@sergas.es)

**Moitas grazas pola súa colaboración.**

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA A PARTICIPACIÓN NO ESTUDO DE INVESTIGACIÓN "DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO (ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA"**

Eu,

1. *Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con Ernesto Veiga Álvarez e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.*
2. *Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.*
3. *Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.*
4. *Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.*

Respecto á conservación DAS MOSTRAS recollidas neste estudo unha vez terminado o mesmo, conforme o RD 1716/2011, serán:

- ***Destruidas***

Asdo.: O/a participante,

Asdo.: Parella

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_ Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Data:

Data:

Asdo.: O/a investigador/a que solicita o consentimento

Nome e  
apelidos: \_\_\_\_\_

Data:



**DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO ANTE TESTEMUÑAS  
PARA A PARTICIPACIÓN NO ESTUDO DE INVESTIGACIÓN  
"DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS  
INFECCIONES DEL TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO  
(ITREM) EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA"**

*(para os casos no que o participante non pode lee/escribir)*

*A testemuña imparcial terá que identificarse e ser una persoa allea ao equipo investigador*

Eu \_\_\_\_\_,

*como testemuña imparcial, afirmo que na miña presenza:*

- 1. Se lle leu a \_\_\_\_\_  
a folla de información ao participante do estudo arriba  
mencionado que se lle entregou, e puido facer todas as  
preguntas sobre o estudo.*
- 2. Comprende que a súa participación é voluntaria, e que pode  
retirarse do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións  
e sen que isto repercuta nos seus coidados médicos.*
- 3. Accede a que se utilicen os seus datos e mostras nas  
condicións detalladas na folla de información ao participante.*
- 4. Presta libremente a súa conformidade para participar neste  
estudo.*

*Respecto á conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste  
estudo conforme o RD1716/2011:*

*- Non accedeu a que sexan conservadas unha vez terminado o  
estudo.*

Asdo.: O/a testemuña

Asdo.:O/a investigador/a  
que solicita o  
consentimento

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Data:

Data:

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA  
REPRESENTANTE LEGAL PARA A PARTICIPACIÓN NUN  
ESTUDO DE INVESTIGACIÓN "DESARROLLO DE UN  
PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS INFECCIONES DEL  
TRACTO REPRODUCTIVO MASCULINO (ITREM) EN  
REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA"**

*Eu, \_\_\_\_\_,  
representante legal de \_\_\_\_\_:*

- 1. Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con Ernesto Veiga Álvarez e facer todas as preguntas sobre o estudo.*
- 2. Comprendo que a súa participación é voluntaria, e que pode retirarse do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos seus coidados médicos.*
- 3. Accedo a que se utilicen os seus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.*
- 4. Presto libremente a miña conformidade para que participe neste estudo.*

*Respecto á conservación e utilización DAS MOSTRAS  
recollidas neste estudo conforme o RD1716/2011:*

*- Non accedeu a que sexan conservadas unha vez terminado  
o estudo.*

*Asdo.: O/a representante legal, Asdo.: O/a investigador/a que solicita  
o consentimento*

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_ Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Data:

Data:

## Anexo 5. Índice de Síntomas de Prostatitis Crónica (NIH-CPSI) (versión en español)

### NIH - Índice de Síntomas de Prostatitis Crónica (NIH-CPSI) (versión en español)

#### 1. Dolor o molestia

Durante la semana pasada, ¿ha tenido usted dolor o molestia en las partes del cuerpo siguiente?

Sí No

a. En el área entre el recto y los testículos (perineo) ☐ 1 ☐ 0

b. En los testículos ☐ 1 ☐ 0

c. En la punta del pene (dolor o molestia no relacionados con orinar) ☐ 1 ☐ 0

d. Debajo de la cintura, en el área del pubis o de la vejiga ☐ 1 ☐ 0

2. Durante la semana pasada, ¿ha tenido usted...?

Sí No

a. ¿Dolor o ardor al orinar? ☐ 1 ☐ 0

b. ¿Dolor o molestia durante o después del orgasmo (eyaculación)? ☐ 1 ☐ 0

3. Durante la semana pasada, ¿con qué frecuencia ha tenido usted dolor o molestia en alguna de las partes de su cuerpo indicadas arriba en la primera pregunta?

- ☐ 0 Nunca  
☐ 1 Pocas veces  
☐ 2 Algunas veces  
☐ 3 Muchas veces  
☐ 4 Casi siempre  
☐ 5 Siempre

4. ¿Qué número describe mejor el nivel PROMEDIO de dolor o molestia, en los días que lo tuvo, durante la semana pasada? (los números de menor a mayor que aparecen abajo sirven para indicar que el dolor va de débil a fuerte)

☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10

Sin dolor

Dolor tan fuerte como usted se pueda imaginar

#### 5. Orinar

Durante la semana pasada, ¿con qué frecuencia ha tenido usted la sensación de que no se le vació completamente la vejiga al terminar de orinar?

- ☐ 0 Ni una vez  
☐ 1 Menos de 1 de cada 5 veces  
☐ 2 Menos de la mitad de las veces  
☐ 3 Más o menos la mitad de las veces  
☐ 4 Más de la mitad de las veces  
☐ 5 Casi siempre

6. Durante la semana pasada, ¿con qué frecuencia tuvo usted que volver a orinar menos de dos horas después de haber orinado?

- ☐ 0 Ni una vez  
☐ 1 Menos de 1 de cada 5 veces  
☐ 2 Menos de la mitad de las veces  
☐ 3 Más o menos la mitad de las veces  
☐ 4 Más de la mitad de las veces  
☐ 5 Casi siempre

#### 7. Efecto de los síntomas

Durante la semana pasada, ¿cuánto han impedido sus síntomas que usted hiciera las cosas que habitualmente hace?

- ☐ 0 Nada  
☐ 1 Sólo un poco  
☐ 2 Algo  
☐ 3 Mucho

8. ¿Cuánto pensó en sus síntomas durante la semana pasada?

- ☐ 0 Nada  
☐ 1 Sólo un poco  
☐ 2 Algo  
☐ 3 Mucho

#### 9. Calidad de vida

¿Cómo se sentiría si tuviera que pasar el resto de su vida con síntomas iguales a los que ha tenido durante la semana pasada?

- ☐ 0 Encantado  
☐ 1 Complacido  
☐ 2 En general, satisfecho  
☐ 3 Con sentimientos contrarios, confundido (igualmente satisfecho e insatisfecho)  
☐ 4 En general, insatisfecho  
☐ 5 Descontento  
☐ 6 Muy mal

#### Puntuación del NIH - Índice de Síntomas de Prostatitis Crónica

Dolor: Total de las preguntas 1a, 1b, 1c, 1d, 2a, 2b, 3 y 4 =

Síntomas urinarios: Total de preguntas 5 y 6 =

Efecto sobre la calidad de vida: Total de las preguntas 7, 8 y 9 =

TOTAL

Por favor, conteste cada pregunta marcando una casilla. Si no está seguro de cómo responder a una pregunta, por favor, conteste lo que le parezca más cierto.



## Anexo 6. Normas para la recolección de una muestra de semen

**NORMAS PARA LA RECOLECCIÓN DE UNA MUESTRA DE SEMEN**

**Si usted presenta fiebre alguna de los 30 días previos a su cita, llame para comunicarlo y aplazarla. 981 955311 (8-15 horas). Una vez que ya no tenga fiebre, se recomienda tener por lo menos 3 eyaculaciones (1 cada 42-64 horas) la semana previa a la nueva cita de recogida del semen para la realización del seminograma.**

- Período de abstinencia sexual (ya sea por masturbación, coito o polución nocturna) previo a la recogida de la muestra de **2-3 días y NUNCA más de 7 días**. El objetivo es estandarizar la recogida, por ello, se recomiendan de 42-64 horas de abstinencia, y **tener por lo menos 3 eyaculaciones con el mismo periodo de abstinencia la semana previa a la recogida.**

- **Le llamarán por teléfono para darle la cita (día y la hora que tendrá que venir para la recogida de la muestra de semen).** Normalmente se recogerá en la Unidad de Reproducción Humana Asistida (**Bloque A, planta Baja, pasillo de partos**) donde se le suministrará el recipiente de plástico para la recogida (**lo debe proporcionar el laboratorio, atemperado entre 20-37°C antes de la recogida**).

- Mantenga en todo momento las **condiciones de higiene**: ese mismo día y antes de la recogida, orinar y posteriormente lavarse las manos y genitales (fundamentalmente el **glande**) con agua y jabón (**eliminar muy bien el jabón con mucha agua**), y posteriormente secarse con **gasas estériles**. Obtener la muestra por **masturbación** directa en el frasco de recogida estéril y de un solo uso (**no utilizar lubricantes** tipo vaselina, saliva, etc., durante la masturbación). **Nunca** recoger la muestra practicando *coitus interruptus o sexo oral*. Asegurarse que el frasco queda bien cerrado.

- **No** se deben utilizar **preservativos normales** para la recolección de la muestra. Para los pacientes que no sean capaces de recoger la

muestra por masturbación, la pareja puede colaborar en la recogida o bien existen preservativos especiales de poliuretano sin lubricantes ni espermicidas disponibles en las Farmacias.

- Una vez recogida la muestra, protegerla de temperaturas  $< 20^{\circ}\text{C}$  o  $> 37^{\circ}\text{C}$ , y de la luz durante su transporte al Laboratorio. **Si se recoge fuera del Hospital** envolver el frasco en **papel opaco o de aluminio** inmediatamente después de recoger la muestra, y nunca la guarde en nevera, **transportándola en un bolsillo en contacto con el cuerpo. NUNCA invertir el frasco de recogida.**

- La **muestra** deberá **llegar al Laboratorio** para su análisis o procesado lo antes posible, **nunca después de 30 minutos.**

- Al entregar la muestra se deberá rotular el frasco de recogida (tanto en la parte lateral como en la tapa) con los siguientes **datos** que le comunicará a la persona que la recepcione: nombre de la pareja, fecha de nacimiento, fecha y hora de recogida de la muestra, hora de llegada al Laboratorio, hora de la última eyaculación por masturbación, polución nocturna o coito, forma recogida, dificultades en la recolección, **pérdida de parte de la muestra (NO válida para estudio)**, procesos febriles anteriores al estudio, medicación reciente, infecciones urogenitales recientes, **asegurarse de que sólo ha recogido una eyaculación**, incidencias.  
**Si tiene alguna duda consulte con el Laboratorio.**

## Anexo 7. Variables analizadas mediante SPSS

id: codificación de la pareja. Variable cuantitativa discreta.

edadh: variable que recoge la edad de cada uno de los participantes hombres en años y en valores enteros. Variable cuantitativa discreta.

edadhc: variable que agrupa la edad de cada uno de los participantes hombres en 4 categorías de años (<25, 25-34, 35-44, 45-54 años). Variable cualitativa ordinal.

edadm: variable que recoge la edad de cada una de las participantes mujeres en años y en valores enteros. Variable cuantitativa discreta.

razah: variable que recoge el tipo de raza de cada uno de los participantes hombres. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

tipoinfer: variable que recoge el tipo de esterilidad de la pareja (primaria o secundaria). Variable cualitativa categórica nominal binaria.

\* La esterilidad primaria se refiere a las parejas que no han podido quedar embarazadas después de al menos un año de relaciones sexuales sin usar métodos anticonceptivos.

\* La esterilidad secundaria se refiere a las parejas que han podido quedar embarazadas al menos una vez, pero que ahora no pueden.

durinf: variable que recoge la duración de la esterilidad de la pareja en meses. Variable cuantitativa discreta.

dxinf: variable que recoge el diagnóstico de esterilidad de la pareja (masculina, femenina, mixta ó EOD). Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

infm: variable que recoge causa de esterilidad de cada una de las participantes mujeres. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

inhf: variable que recoge causa de esterilidad cada uno de los participantes hombres. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

tabh: esta variable se refiere al consumo de tabaco o no de cada uno de los participantes hombres. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

cigh: variable que recoge el número de cigarrillo/día que consume cada uno de los participantes hombres fumadores. Variable cuantitativa discreta.

ohh: variable que se refiere al consumo de alcohol superior a 28 U/semana o no en cada uno de los participantes hombres bebedores de alcohol. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

its: variable que se refiere a la presencia o no previa de ITS previa a la participación en el estudio en uno o en ambos de los miembros integrantes de cada una de las parejas participantes. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

itsh: variable que se refiere al tipo de ITS sufrida previamente a la participación en el estudio en cada uno de los participantes hombres. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

itsm: variable que se refiere al tipo de ITS sufrida previamente a la participación en el estudio en cada una de las participantes mujeres. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

item: variable que indica presencia o no de infección del tracto reproductivo masculino detectada mediante el protocolo de estudio. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

leu: variable que indica la presencia o no de leucocitospermia (> 1 Millón/mL PMN) en el eyaculado fresco analizado. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

bact: variable que indica presencia o no de bacterias patógenas o contaminación en alguna de las muestras analizadas en el estudio del hombre (O1, O2, semen u O3). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

hong: variable que indica presencia o no de hongos en alguna de las muestras analizadas en el estudio del hombre (O1, O2, semen u O3). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mg: variable que se refiere a la presencia o no de *Mycoplasma genitalium* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mgt1: variable que indica el tipo de tratamiento de elección (azitromicina) utilizado en caso de presencia de *M. genitalium* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.



mghpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *M. genitalium* en la O1 del hombre tras el tratamiento de elección (azitromicina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mgmpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *M. genitalium* en la O1 de la mujer tras el tratamiento de elección (azitromicina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mh: variable que se refiere a la presencia o no de *Mycoplasma hominis* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mht1: variable que indica el tipo de tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina) utilizado en caso de presencia de *M. hominis* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

mhhpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *M. hominis* en la O1 del hombre tras el tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mhmpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *M. hominis* en la O1 de la mujer tras el tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mht2: variable que indica el tipo de tratamiento alternativo utilizado (levofloxacino) en caso de presencia de *M. hominis* en la O1 del hombre/mujer tras el tratamiento de elección. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

mhhpt2: variable que se refiere a la presencia o no de *M. hominis* en la O1 del hombre tras el primer tratamiento alternativo utilizado (levofloxacino) en caso de presencia de *Mycoplasma hominis* en la O1 del hombre/mujer tras el tratamiento de elección. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mhmpt2: variable que se refiere a la presencia o no de *M. hominis* en la O1 de la mujer tras el primer tratamiento alternativo utilizado (levofloxacino) en caso de presencia de *M. hominis* en la O1 del hombre/mujer tras el tratamiento de elección. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mht3: variable que indica el segundo tratamiento alternativo (moxifloxacino) utilizado en caso de presencia de *M. hominis* en la O1

del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

mhhpt3: variable que se refiere a la presencia o no de *M. hominis* en la O1 del hombre tras el segundo tratamiento alternativo utilizado (moxifloxacino) en caso de presencia de *M. hominis* en la O1 del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

mhmpt3: variable que se refiere a la presencia o no de *M. hominis* en la O1 de la mujer tras el segundo tratamiento alternativo utilizado (moxifloxacino) en caso de presencia de *M. hominis* en la O1 del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uu: variable que se refiere a la presencia o no de *Ureaplasma urealyticum* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uut1: variable que indica el tipo de tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina) utilizado en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

uuht1: variable que se refiere a la presencia o no de *U. urealyticum* en la O1 del hombre tras el tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uumpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *U. urealyticum* en la O1 de la mujer tras el tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uut2: variable que indica el tipo de tratamiento alternativo utilizado (doxiciclina, levofloxacino) en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el tratamiento de elección. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

uuht2: variable que se refiere a la presencia o no de *U. urealyticum* en la O1 del hombre tras el primer tratamiento alternativo utilizado (doxiciclina, levofloxacino) en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el tratamiento de elección. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uumpt2: variable que se refiere a la presencia o no de *U. urealyticum* en la O1 de la mujer tras el primer tratamiento alternativo utilizado (doxiciclina, levofloxacino) en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el tratamiento de elección. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uut3: variable que indica el segundo tratamiento alternativo utilizado (levofloxacino, clindamicina) en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

uuht3: variable que se refiere a la presencia o no de *U. urealyticum* en la O1 del hombre tras el segundo tratamiento alternativo utilizado (levofloxacino, clindamicina) en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uumpt3: variable que se refiere a la presencia o no de *U. urealyticum* en la O1 de la mujer tras el segundo tratamiento alternativo utilizado (levofloxacino, clindamicina) en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uut4: variable que indica el tercer tratamiento alternativo utilizado (clindamicina) en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa cualitativa categórica nominal policotómica.

uuht4: variable que se refiere a la presencia o no de *U. urealyticum* en la O1 del hombre tras el tercer tratamiento alternativo utilizado (clindamicina) en caso de presencia de *U. urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

uumpt4: variable que se refiere a la presencia o no de *U. urealyticum* en la O1 de la mujer tras el tercer tratamiento alternativo utilizado (clindamicina) en caso de presencia de *Ureaplasma urealyticum* en la O1 del hombre/mujer tras el primer tratamiento alternativo. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

ct: variable que se refiere a la presencia o no de *Chlamydia trachomatis* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

ctt1: variable que indica el tipo de tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina) utilizado en caso de presencia de *C. trachomatis* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

cthpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *C. trachomatis* en la O1 del hombre tras el tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

ctmpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *C. trachomatis* en la O1 de la mujer tras el tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

ng: variable que se refiere a la presencia o no de *Neisseria gonorrhoeae* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

ngt1: variable que indica el tipo de tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina) utilizado en caso de presencia de *N. gonorrhoeae* en la O1 del hombre. Variable cualitativa categórica nominal policotómica.

nghpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *N. gonorrhoeae* en la O1 del hombre tras el tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

ngmpt1: variable que se refiere a la presencia o no de *N. gonorrhoeae* en la O1 de la mujer tras el tratamiento de elección (azitromicina, luego doxiciclina). Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

hpvh: variable que se refiere a la presencia o no del Virus del Papiloma Humano (VPH) en la muestra de semen del hombre. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

hpmh: variable que se refiere a la presencia o no del Virus del Papiloma Humano (VPH) en la muestra de moco cervical de la mujer. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

O1: variable que se refiere a la detección o no de algún microorganismo patógeno o bien la existencia de microbiota diversa en la fracción inicial de orina del hombre. Variable cualitativa nominal.

microO1: variable que se refiere al microorganismo patógeno detectado en la fracción inicial de orina del hombre. Variable cualitativa nominal.

O1pt: variable que se refiere a la detección o no de algún microorganismo patógeno o bien la existencia de microbiota diversa en la fracción inicial de orina del hombre tras tratamiento del microorganismo detectado en O1. Variable cualitativa nominal.

O2: variable que se refiere a la detección o no de algún microorganismo patógeno o bien la existencia de microbiota diversa en la fracción media de orina del hombre. Variable cualitativa nominal.

microO2: variable que se refiere al microorganismo patógeno detectado en la fracción media de orina del hombre. Variable cualitativa nominal.

O2pt: variable que se refiere a la detección o no de algún microorganismo patógeno o bien la existencia de microbiota diversa en la fracción media de orina del hombre tras tratamiento del microorganismo detectado en O2. Variable cualitativa nominal.

sem: variable que se refiere a la detección o no de algún microorganismo patógeno o bien la existencia de microbiota diversa en el semen del hombre aportado para cultivo. Variable cualitativa nominal.

micrsem: variable que se refiere al microorganismo patógeno detectado en el semen del hombre aportado para cultivo. Variable cualitativa nominal.

semt: variable que se refiere a la detección o no de algún microorganismo patógeno o bien la existencia de microbiota diversa en el semen del hombre aportado para cultivo tras tratamiento del microorganismo detectado en semen. Variable cualitativa nominal.

tv: variable que se refiere a la presencia o no de *Trichomona vaginalis* en el semen del hombre aportado para cultivo. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

gram: variable que se refiere a la positividad o no de la tinción de gram en el semen del hombre aportado para cultivo. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

O3: variable que se refiere a la detección o no de algún microorganismo patógeno o bien la existencia de microbiota diversa en la fracción final de orina del hombre. Variable cualitativa nominal.

micrO3: variable que se refiere al microorganismo patógeno detectado en la fracción final de orina del hombre. Variable cualitativa nominal.

O3pt: variable que se refiere a la detección o no de algún microorganismo patógeno o bien la existencia de microbiota diversa en la fracción final de orina del hombre tras tratamiento del microorganismo detectado en O3. Variable cualitativa nominal.

vol: variable que se refiere a los mL de la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

pH: variable que se refiere al pH de la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

vis: variable que se refiere a la viscosidad de la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cualitativa ordinal.

agreg: variable que se refiere a la presencia de espermatozoides agregados en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cualitativa ordinal.

aglut: variable que se refiere a la presencia de espermatozoides aglutinados en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cualitativa ordinal.

PMN: variable que se refiere a la cantidad de células peroxidasa positivo observadas en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

MART: variable que se refiere a la positividad o no del MAR Test en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cualitativa categórica nominal dicotómica.

esperm: variable que se refiere al número de espermatozoides en millones/ml en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

PR: variable que se refiere al porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

NPR: variable que se refiere al porcentaje de espermatozoides con movilidad no progresiva en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

INM: variable que se refiere al porcentaje de espermatozoides inmóviles en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

MOV: variable que se refiere al porcentaje de espermatozoides móviles totales en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

morfnor: variable que se refiere al porcentaje de espermatozoides con morfología normal en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

morfanor: variable que se refiere al porcentaje de espermatozoides con morfología anormal en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

anomorf: variable que se refiere a la anomalía más frecuente observada en los espermatozoides con morfología anormal en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cualitativa nominal.

REM: variable que se refiere al número total de espermatozoides con movilidad progresiva recuperados en millones tras aplicar la técnica de gradientes de densidad a la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Variable cuantitativa continua.

vit: variable que se refiere al porcentaje de espermatozoides vivos (test de eosina-nigrosina) en la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma. Se realiza sólo si el valor de la variable INM es  $> 60\%$ . Variable cuantitativa continua.

dxsem: variable que se refiere al diagnóstico de la muestra de semen del hombre aportada para la realización del seminograma aplicando los criterios de la WHO 2010. Variable cualitativa categórica policotómica.

dolor: variable dolor del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-21 puntos: 6+5+10). Variable cuantitativa discreta.

dolorloc: variable indica la localización del dolor del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-6 puntos). Variable cuantitativa discreta.

dolorfre: variable indica la frecuencia del dolor del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-5 puntos). Variable cuantitativa discreta.



dolorsev: variable indica la severidad del dolor del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-10 puntos). Variable cuantitativa discreta.

scoredolor: variable que refleja la puntuación del dolor del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis categorizado en tres categorías (Leve: 0-7 puntos; Moderado: 8-13 puntos; Severo 14-21 puntos). Variable cualitativa ordinal.

sinturi: variable síntomas urinarios del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-10 puntos). Variable cuantitativa discreta.

dolorsin: variable suma de la variable dolor del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-21 puntos: 6+5+10) y la variable sinturi síntomas urinarios del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-10 puntos). Variable cuantitativa discreta.

scoredosin: variable que refleja la puntuación conjunto de la suma de la puntuación del dolor (puntuación a) y puntuación síntomas urinarios (puntuación b), denominados en conjunto puntuación de escala de síntomas (symptom scale score) del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis categorizado en tres categorías (Leve: 0-9 puntos; Moderado: 10-18 puntos; Severo 19-31 puntos). Variable cualitativa ordinal.

efcalvida: variable efecto sobre la calidad de vida del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-12 puntos: 6+6). Variable cuantitativa discreta.

calsint: variable efecto sobre la calidad de vida de los síntomas del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-6 puntos). Variable cuantitativa discreta.

calvida: variable calidad de vida del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-6 puntos). Variable cuantitativa discreta.

nihcpsito: variable suma total de puntos del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis (0-43 puntos). Variable cuantitativa discreta.

scoreto: variable que refleja la puntuación suma total de puntos del cuestionario NIH-CPSI de síntomas de prostatitis recodificado en tres categorías en función de la probabilidad de tener una prostatitis (Poco probable: 0-3 puntos; Probable: 4-7 puntos; Muy probable: 8-43 puntos). Variable cualitativa ordinal.



Anexo 8. Permisos para reproducir material.

Todas las figuras utilizadas en esta tesis doctoral son originales del autor o han sido reimpresas con el permiso de la correspondiente Sociedad Propietario de los derechos de autor, con referencias a continuación.

**Figura 1.1 Sistema reproductor masculino.**

*Drawing of the Male Internal Sexual Anatomy*

*Permiso CC-BY-SA-3.0-migrated. Sin cambios.*

*[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Male\\_anatomy\\_number.svg?uselang=es](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Male_anatomy_number.svg?uselang=es)*

**Figura 1.2 Glándulas accesorias.**

*Raziel: Prostate et vesicules seminales. Permiso: CC BY 2.5.Sin cambios.*

*[https://es.wikipedia.org/wiki/Pr%C3%B3stata#/media/File:Prostate\\_et\\_vesicules\\_seminales.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Pr%C3%B3stata#/media/File:Prostate_et_vesicules_seminales.jpg)*

**Figura 1.3 Algoritmo de decisión tras prueba primaria de VPH.**

Original del autor basada en el Practice Bulletin No. 168 Summary: Cervical Cancer Screening and Prevention. Obstet Gynecol. 2016 Oct;128(4):923-5.

**Figura 1.4 Tinción de Gram.**

*Microscopic image of a Gram stain of mixed Gram-positive cocci (Staphylococcus aureus ATCC 25923, purple) and Gram-negative bacilli (Escherichia coli ATCC 11775, red). Magnification:1,000.*

*Permiso: CC BY SA 3.0,2.5,2.0,1.0. Sin cambios.*

*[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gram\\_stain\\_01.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gram_stain_01.jpg)*

**Esquema 3.1 Protocolo de estudio de ITREM en RHA.**

Original del autor.

**Figura 3.1. Espermatozoides agregados unidos a células epiteliales (a), detritus (b) o espermatozoides (c, d).**

*Reimpreso de WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edition, 2010, ISBN: 978 92 4*

154778 9, Página 19, Figura 2.2; con permiso de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Número de autorización: 282070.

<https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>

**Figura 3.2. Grados y tipos de aglutinación espermática.**

*Reimpreso de WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edition, 2010, ISBN: 978 92 4 154778 9, Página 20, Figura 2.3; con permiso de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) y de traducción. Número de autorización: 282070.*

<https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>

**Figura 3.3. Equipo estándar SCA de Microptic.**

*Reimpreso de SCA®-Sperm Class Analyzer®Manual Rápido SCA® para Humano, 2016, © 2016 MICROPTIC S.L.; con permiso de Microptic S.L.; 8 de abril de 2019.*

**Figura 3.4. Ejemplo de captura mediante el software SCA® para la valoración de los distintos tipos de movilidad espermática.**

*Reimpreso de SCA®-Sperm Class Analyzer®Manual Rápido SCA® para Humano, 2016, © 2016 MICROPTIC S.L.; con permiso de Microptic S.L.; 8 de abril de 2019.*

**Figura 3.5. Valores morfométricos definidos en el software SCA® para la valoración de la morfología espermática basado en la WHO 2010.**

*Reimpreso de SCA®-Sperm Class Analyzer®Manual Rápido SCA® para Humano, 2016, © 2016 MICROPTIC S.L.; con permiso de Microptic S.L.; 8 de abril de 2019.*

**Figura 3.6. Ejemplo de captura mediante el software SCA® para la valoración de la morfología espermática.**

*Reimpreso de SCA®-Sperm Class Analyzer®Manual Rápido SCA® para Humano, 2016, © 2016 MICROPTIC S.L.; con permiso de Microptic S.L.; 8 de abril de 2019.*

**Figura 3.7. Prueba de vitalidad eosina-nigrosina.**

*Reimpreso de WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edition, 2010, ISBN: 978 92 4 154778 9, Página 28, Figura 2.5; con permiso de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Número de autorización: 282070.*  
<https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>

**Figura 3.8 Técnica de gradientes de densidad**

Original del autor.

**Esquema 4.1. Participantes en el estudio.**

Original del autor.

**Figura 4.1. Histograma de frecuencia de la edad de los hombres.**

Original del autor.

**Figura 4.2. Histograma de frecuencia de la edad de las mujeres.**

Original del autor.

**Figura 4.3. Histograma de frecuencia de la duración en meses de esterilidad en la pareja.**

Original del autor.

**Figura 4.4. Causas de esterilidad de tipo femenino.**

Original del autor.

**Figura 4.5. Causas de esterilidad de tipo masculino.**

Original del autor.

**Figura 4.6. Distribución del número de PMN en las muestras de semen.**

Original del autor.

**Figura 4.7 Esterilidad tubárica y positividad de ITREM.**

Original del autor.

**Figura 4.8 Esterilidad tubárica y detección de U.urealyticum/parvum en la pareja.**

Original del autor.

**Figura 4.9** Diagrama de dispersión que representa los valores exactos frente a los predichos por el modelo  $PR$  vs  $tabh + itrem$  representando la bondad de ajuste del mismo.

Original del autor.

**Figura 4.10** Variable INM tras transformación exponencial para normalizar la misma (imagen obtenida con el software R-Commander paquete Gamless).

Original del autor.

**Figura 4.11** Diagrama de dispersión que representa los valores exactos frente a los predichos por el modelo  $\ln INM$  vs  $tabh + itrem$  representando la bondad de ajuste del mismo.

Original del autor.

**Figura 4.12** Diagrama de asociación  $scoreto*itrem$ .

Original del autor.

**Figura 4.13** Curva ROC  $nihepsito*itrem$ .

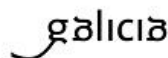
Original del autor

## Anexo 9. Aspectos éticos



XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



## DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

## CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 22/09/2015 o estudo:

**Título:** Desarrollo de un protocolo de estudio de las Infecciones del Tracto Reproductivo Masculino (ITREM) en reproducción humana asistida

**Promotor:** Ernesto Veiga Álvarez

**Tipo de estudo:** Outros

**Código de Rexistro:** 2015/493

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así como os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e a Circular nº 07/2004, investigacións clínicas con produtos sanitarios.
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así como os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

Centros	Investigadores Principais
C.H. Universitario de Santiago	Ernesto Veiga Álvarez

En Santiago de Compostela, a 23 de setembro de 2015

O secretario

NOMBRE VAZQUEZ  
LAGO JUAN MANUEL  
• NIF 44829259M

Juan M. Vázquez Lago